

FERNANDA CAMPOS MACHADO

**PARÂMETROS PERIODONTAIS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS DE
MULHERES NA GESTAÇÃO E NO PÓS-PARTO**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Saúde: Área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosangela Almeida Ribeiro

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Dionéia Evangelista Cesar

Juiz de Fora

2012

FERNANDA CAMPOS MACHADO

**Parâmetros periodontais clínicos e microbiológicos
de mulheres na gestação e no pós-parto**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Saúde: Área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Saúde.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rosangela Almeida Ribeiro
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Saul Martins de Paiva
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^a. Dr^a. Glória Fernanda Barbosa de Araújo Castro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Dionéia Evangelista Cesar
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Neusa Maria Souza Picorelli Assis
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sempre iluminar o meu caminho e me acompanhar diariamente.

Aos meus pais, **João Alberto e Maria José**, pelo amor e afeto incondicionais e, principalmente, por me apoiar a cada segundo da minha vida. Obrigada por fazerem dos meus sonhos as suas próprias realizações. Sou o que sou porque sou parte de vocês!

Aos meus irmãos, **Murilo e Sérgio**, por acreditarem no meu sonho e estarem sempre ao meu lado, compartilhando todos os momentos da minha vida. Obrigada por tudo!

Ao meu grande amor, **Brenno**, pelo carinho, compreensão e, acima de tudo, pelo seu grande companheirismo. Muito obrigada por sempre entender e estar ao meu lado nos finais de semana de trabalho e nos meus dias de estresse e cansaço. Sem você tudo seria muito mais difícil! Te amo!

A toda minha **Família**, tios e tias, primos e primas, sobrinhas, cunhadas, sogra e sogro, por sempre me apoiarem e acreditarem que tudo vai dar certo.

À **Professora Rosangela**, meu sincero agradecimento por todos os ensinamentos, amizade, carinho e, principalmente, pela disponibilidade. Um exemplo de dedicação, competência e profissionalismo. Tenho uma enorme gratidão e admiração por você, que desde o início sempre me acompanhou e me ajudou a crescer profissionalmente. Esta conquista é nossa!

À **Professora Dionéia**, muito obrigada pela amizade, acolhimento e pela oportunidade de trabalhar com você! Agradeço pelos ensinamentos e dedicada orientação, que certamente foram indispensáveis para o meu crescimento profissional e para o êxito deste trabalho.

Ao **Professor Cláudio**, pelos ensinamentos e por me receber sempre de forma tão gentil e solícita.

Ao **Professor Luiz Cláudio**, pela grande ajuda nas análises estatísticas e por todos os ensinamentos. Muito obrigada!

À **Professora Glorinha**, eterna amiga, muito obrigada pelo carinho e por continuar me incentivando, mesmo à distância. Você é um grande exemplo que eu quero sempre seguir!

Às queridas alunas, **Amanda, Fernanda, Camila e Flávia**! Muito obrigada por toda ajuda com as coletas dos dados e amostras das pacientes e com os procedimentos laboratoriais. Vocês foram indispensáveis para a realização deste trabalho!

Às queridas amigas, **Cristina e Renata**, por dividirem muitos momentos difíceis e alegres. Muito obrigada pelo ótimo convívio de trabalho quase diário, pelo incentivo e ajuda!

Às **minhas grandes amigas que tanto amo**, especialmente Maria, Tatiana, Isabelle, Juliana, Marina, Paulinha, Renatinha, Isa, Lu, Susana, Tati Dias, Claudinha e Bia, pela torcida e incentivo e, principalmente, por compreenderem minha ausência em momentos especiais. *“O que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. Bons amigos são a família que Deus nos permitiu escolher”*

À **Cristiane**, por dividir comigo, além da bolsa de doutorado, muitos momentos e experiências ao longo desses quatro anos.

Aos **amigos do Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microorganismos**, pela ajuda e gentileza com que sempre me trataram.

Aos **amigos e professores do Departamento de Odontologia Social e Infantil** pelos momentos compartilhados, pelo exemplo e grande incentivo.

Aos **amigos, professores e alunos da Faculdade Estácio de Sá** pelo incentivo e compreensão nos momentos que não pude me dedicar como gostaria à Faculdade.

Aos **professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Saúde**, por compartilharem seus conhecimentos e experiências.

A todas as **mulheres voluntárias** que participaram deste estudo, pela colaboração e disponibilidade.

A toda equipe da **Maternidade Terezinha de Jesus** e das **Unidades Básicas de Saúde** por abrirem suas portas, ajudando no contato e seleção das pacientes, viabilizando, assim, a realização deste estudo.

Aos meus queridos **alunos e pequenos pacientes**, motivo pelo qual quero sempre melhorar e me aperfeiçoar profissionalmente.

À **Capes**, pela bolsa de Doutorado, e ao **PPgS**, pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

Meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma contribuíram para a minha formação como pessoa, professora, pesquisadora e profissional.

“Quando nada parece dar certo, vou ver o cortador de pedras a martelar numa rocha talvez 100 vezes, sem que uma única rachadura apareça. Mas na centésima primeira martelada a pedra abre-se em duas, e eu sei que não foi aquela que conseguiu isso, mas todas as que vieram antes.”

Jacob Riis

RESUMO

Os níveis de estrógeno e progesterona, necessários à manutenção da gestação, podem contribuir para a maior suscetibilidade ao aparecimento de determinados micro-organismos periodontopatogênicos e consequente desenvolvimento da doença periodontal em gestantes. O objetivo desta investigação foi avaliar os parâmetros periodontais clínicos e microbiológicos de mulheres na gestação e no pós-parto. Os achados das gestantes foram comparados com os de um grupo controle de não gestantes. Este estudo longitudinal prospectivo, com desenho transversal paralelo, incluiu 31 mulheres no segundo trimestre da gestação, acompanhadas em dois momentos após o parto (48 horas e oito semanas) e 20 não gestantes na mesma faixa etária. O exame clínico determinou a condição periodontal das mulheres por meio dos seguintes indicadores: sangramento à sondagem (SS), presença de cálculo (PC), profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI). Amostras de biofilme subgengival e saliva foram coletadas e a identificação e quantificação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* foram realizadas pela técnica da hibridização *in situ* fluorescente (FISH). O teste *U* de *Mann-Whitney* foi utilizado para a comparação clínica e microbiológica entre os grupos de gestantes e não gestantes. Para a comparação intragrupo, foi empregado o teste de *Friedman*, seguido pelo teste de *Wilcoxon*. Os grupos de gestantes e não gestantes apresentaram condições periodontais semelhantes. Em relação à microbiota verificada no biofilme subgengival, não foi encontrada diferença significativa entre as mulheres no segundo trimestre de gestação e as não gestantes. Em relação à microbiota salivar, foi observada maior abundância de *P. intermedia* nas gestantes, em comparação com as não gestantes. Na comparação intragrupo dos parâmetros clínicos, o teste de *Friedman* demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação à PS=4-5 mm, não confirmada pelo teste de *Wilcoxon*. Em relação aos parâmetros microbiológicos, no biofilme subgengival foi verificado que os números de *P. nigrescens* diminuíram ao longo dos três momentos avaliados, que números significativamente mais altos de *C. rectus* foram encontrados durante o segundo trimestre, em comparação com o exame de oito

semanas após o parto, e que níveis significativamente mais altos de *P. intermedia* foram observados 48 horas após o parto, em comparação com o exame de oito semanas após o parto. Na saliva, foi verificada uma redução significativa de *P. intermedia* e *P. nigrescens* ao longo do acompanhamento longitudinal, com os maiores valores encontrados no segundo trimestre da gestação. Em conclusão, os resultados confirmaram a hipótese de que existe uma alteração na microbiota durante a gestação, pelo menos para *P. nigrescens*, *P. intermedia* e *C. rectus*, embora pequena diferença tenha sido verificada em relação aos parâmetros clínicos.

Palavras-chave: Gestação. Saúde Bucal. Doenças Periodontais. Microbiologia. Hibridização In Situ Fluorescente.

ABSTRACT

The levels of estrogen and progesterone necessary for maintenance of pregnancy may contribute to increased susceptibility to the occurrence of certain periodontopathogenic bacteria and subsequent development of periodontal disease in pregnant women. The aim of this study was to evaluate clinical and microbiological parameters in women during pregnancy and post-partum. The findings of the pregnant women were compared with a control group of non-pregnant ones. This longitudinal study, with a cross-sectional parallel design, included 31 women at second trimester of their pregnancy, examined one time during pregnancy and twice during post-partum (48h and 8 weeks after the delivery), and 20 non-pregnant women within the same age range. Bleeding on probing (BOP), presence of calculus (PC), probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL) were recorded. Bacterial samples from the subgingival biofilm and saliva were collected and the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique identified the presence and number of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. The Mann-Whitney *U*-test was applied to compare clinical and microbiological data from pregnant and non-pregnant women. The Friedman and Wilcoxon tests were used for intra-group comparisons. Pregnant and non-pregnant women showed similar periodontal conditions. Regarding the subgingival microbiota, no significant difference was found among women in the second trimester of pregnancy and non-pregnant women. Regarding the salivary microbiota, it was observed higher abundance of *P. intermedia* in pregnant compared with non-pregnant women. In intra-group comparison, for clinical parameters, Friedman test showed significant difference concerning PD = 4-5 mm, not confirmed by the Wilcoxon test. Regarding the microbiological parameters, in the subgingival biofilm it was found that numbers of *P. nigrescens* decreased among the three periods analyzed, increased bacterial counts were found for *C. rectus* from the second trimester to 48h after the delivery, as well as for *P. intermedia* from 48h to 8 weeks post-partum. In saliva, there was a significant reduction of *P. intermedia* and *P. nigrescens* among the longitudinal follow-up, with the highest values found in the second trimester of pregnancy. In

conclusion, the results confirm the hypothesis that there is a change in the microbiota during pregnancy, at least for *P. nigrescens*, *P. intermedia* and *C. rectus*, although little difference was observed in relation to clinical parameters.

Keywords: Pregnancy. Oral Health. Periodontal Diseases. Microbiology. In Situ Hybridization, Fluorescence

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|--------------|---|----|
| Figura 1 | Fluxograma do estudo. As mulheres do grupo de gestantes foram avaliadas em três momentos: segundo trimestre da gestação, 48 horas após o parto e oito semanas após o parto. As mulheres do grupo controle (grupo de não gestantes) foram avaliadas em um momento e comparadas com as gestantes no segundo trimestre de gestação Os parâmetros clínicos e microbiológicos foram verificados em todos os exames | 43 |
| Quadro 1 | Periodontopatógenos e sequência das sondas de oligonucleotídeos de RNAr | 47 |
| Fotografia 1 | Divisão dos filtros de policarbonato em nove partes para a aplicação da solução de hibridização com cada sonda específica | 48 |
| Fotografia 2 | Amostras submetidas às sondas diluídas em solução de hibridização com porcentagem específica em uma concentração final de 2,5 ng/μL | 49 |
| Fotografia 3 | Amostras em câmeras de hibridização para cada sonda específica, colocadas em estufa a 42 °C por uma noite | 49 |
| Fotografia 4 | Colocação dos filtros, após a hibridização, em 1 ml de solução tampão para lavagem e aquecimento em estufa a 48 °C por 15 minutos | 49 |
| Fotografia 5 | Amostras coradas com DAPI por 3 minutos para a contagem das células bacterianas totais..... | 50 |
| Fotografia 6 | Lâmina montada por amostra para posterior visualização em microscópio | 50 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| ABEP | Associação Brasileira de Estudos Populacionais |
| ABNT | Associação Brasileira de Normas Técnicas |
| BBO | Bibliografia Brasileira de Odontologia |
| BDENF | Base de Dados da Enfermagem |
| BIREME | Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde |
| céls | Células |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| CPI | Índice Periodontal Comunitário |
| DAPI | 4,6-diamino-2-fenilindol |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| FISH | Hibridização <i>in situ</i> fluorescente |
| Ig | Imunoglobulinas |
| IL | Interleucinas |
| JAC | Junção amelocementária |
| JF | Juiz de Fora |
| LILACS | Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde |
| MEDCARIBE | Literatura do Caribe em Ciências da Saúde |
| MG | Minas Gerais |
| MEDLINE | <i>Medical Literature Analysis and Retrieval System Online</i> |
| n | Número |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NCI | Nível clínico de inserção |
| PBS | Tampão fosfato-salino |
| PC | Presença de cálculo |
| PCR | Reação da polimerase em cadeia |
| PG | Prostaglandina |
| PGE ₂ | Prostaglandina E ₂ |
| PS | Profundidade de sondagem |

| | |
|---------------|---|
| PUBMED | Base de dados da <i>U.S. National Library of Medicine and National Institutes of Health</i> – Estados Unidos da América |
| RNAr | Ácido ribonucleico ribossômico |
| rpm | Rotações por minuto |
| SB | Saúde bucal |
| SCIELO | <i>Scientific Electronic Library Online</i> |
| SPSS | <i>Statistical Package for Social Science</i> |
| SS | Sangramento à sondagem |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| UFJF | Universidade Federal de Juiz de Fora |
| WHOLIS | <i>World Health Organization Library database</i> |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----------|------------------------|
| g | Gramma |
| °C | Graus Celsius |
| = | Igual |
| > | Maior |
| ≥ | Maior ou igual |
| < | Menor |
| ≤ | Menor ou igual |
| μg | Micrograma |
| μL | Microlitro |
| μm | Micrometro |
| μM | Micromolar |
| M | Molar |
| ml | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| ng | Nanograma |
| % | Por cento |
| <i>P</i> | Nível de significância |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA | 19 |
| 2.1 | DOENÇA PERIODONTAL NA GESTAÇÃO | 19 |
| 2.2 | MICROBIOLOGIA DA DOENÇA PERIODONTAL | 22 |
| 2.3 | MICROBIOTA PERIODONTAL EM GESTANTES | 26 |
| 2.4 | MICROBIOTA PERIODONTAL E DESFECHOS ADVERSOS NA GESTAÇÃO | 30 |
| 2.5 | TÉCNICA DE FISH PARA DIAGNÓSTICO DE MICRO- ORGANISMOS QUE COLONIZAM O PERIODONTO | 34 |
| 3 | HIPÓTESE | 38 |
| 4 | OBJETIVOS | 39 |
| 4.1 | OBJETIVO GERAL | 39 |
| 4.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 39 |
| 5 | METODOLOGIA | 40 |
| 5.1 | LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO | 40 |
| 5.2 | DELINEAMENTO DO ESTUDO | 41 |
| 5.3 | ASPECTOS ÉTICOS | 41 |
| 5.4 | CASUÍSTICA | 42 |
| 5.4.1 | Critérios de inclusão | 42 |
| 5.4.2 | Critérios de exclusão | 42 |
| 5.5 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 43 |
| 5.5.1 | Momentos de avaliação e fluxograma do estudo | 43 |
| 5.5.2 | Instrumento da coleta de dados | 44 |
| 5.5.3 | Coleta de dados | 44 |
| 5.5.3.1 | Entrevista | 44 |
| 5.5.3.2 | Exame físico | 45 |
| 5.5.3.3 | Coleta da comunidade microbiana | 46 |
| 5.5.4 | Tratamento laboratorial da amostra e realização da técnica de FISH | 47 |
| 5.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 51 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 5.6.1 | Análise descritiva | 51 |
| 5.6.1 | Análise inferencial | 51 |
| 5.7 | ESTUDO PILOTO | 51 |
| 5.7.1 | Teste de pesagem da amostra | 52 |
| 5.7.2 | Teste de centrifugação e centrifugação/sonicação da amostra | 53 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 55 |
| 6.1 | ARTIGO CIENTÍFICO INTITULADO “ <i>DETECTION AND ENUMERATION OF PERIODONTOPATHOGENIC BACTERIA IN SUBGINGIVAL BIOFILM OF PREGNANT WOMEN</i> ” | 56 |
| 6.2 | ALTERAÇÕES CLÍNICAS E MICROBIOLÓGICAS NO BIOFILME SUBGENGIVAL DE MULHERES NA GESTAÇÃO E NO PÓS-PARTO | 68 |
| 6.3 | ALTERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS NA SALIVA DE E MULHERES NA GESTAÇÃO E NO PÓS-PARTO E DE UM GRUPO DE NÃO GESTANTES..... | 74 |
| 7 | CONCLUSÃO | 82 |
| | REFERÊNCIAS | 83 |
| | APÊNDICES | 93 |
| | ANEXOS | 105 |

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma das doenças infecciosas mais comuns da humanidade. Refere-se à gengivite, condição inflamatória dos tecidos moles ao redor de um dente, e à periodontite, que envolve a destruição das estruturas de suporte (ligamento periodontal, osso e cimento) e tecidos moles (ALBANDAR; RAMS, 2002; FERGUSON et al., 2007; KINANE, 2001; OFFENBACHER et al., 2001). A doença periodontal se inicia com o crescimento de certas espécies de bactérias, a maioria Gram-negativas, anaeróbias e microaerófilas, que colonizam a região subgengival. Na ausência de higiene bucal adequada, estas acumulam-se no sulco gengival e formam uma estrutura organizada conhecida como biofilme bacteriano (KINANE, 2001).

Embora a etiologia básica da doença periodontal seja a infecção pelo biofilme bacteriano, em algumas condições, como a gestação, outros fatores podem modificar a resposta periodontal às alterações microbianas (BUDUNELI et al., 2005a).

As gestantes parecem particularmente suscetíveis à doença periodontal, a qual se deve às alterações nos níveis dos hormônios sexuais que modificam a ecologia subgengival e favorecem o aparecimento de determinados microorganismos periodontopatogênicos (GÜNCÜ; TÖZÜM; CAGLAYAN, 2005; KORNMAN; LOESCHE, 1980; MURAMATSU; TAKAESU, 1994; NEWMAN, 1985; YOKOYAMA et al., 2008).

Os hormônios sexuais femininos estimulam, principalmente, o crescimento da bactéria anaeróbia Gram-negativa *Prevotella intermedia*, estreitamente associada ao início da doença periodontal (JENSEN; LILJEMARK; BLOOMQUIST, 1981; KORNMAN; LOESCHE, 1980; KORNMAN; LOESCHE, 1982; MURAMATSU; TAKAESU, 1994; RABER-DURLACHER et al., 1994). Mais recentemente, níveis mais altos de *Campylobacter rectus* (YOKOYAMA et al., 2008) e *Prevotella nigrescens* também foram encontrados entre gestantes (GÜRISOY et al., 2009).

Além disso, as bactérias e/ou seus fatores de virulência podem entrar na corrente sanguínea, disseminar-se pelo corpo e induzir respostas inflamatórias sistêmicas e/ou infecções ectópicas. A capacidade de periodontopatógenos e seus fatores de virulência disseminarem-se e induzirem respostas inflamatórias locais e

sistêmicas levantou a hipótese de que a doença periodontal pode ter consequências além dos tecidos periodontais, sugerindo a associação desta doença com um maior risco de intercorrências sistêmicas, como os resultados adversos da gestação – nascimento prematuro, de baixo peso, pré-eclampsia e aborto (BOBETSIS; BARROS; OFFENBACHER, 2006; KATZ et al., 2006; XIONG et al., 2006).

Cabe ressaltar, ainda, que os primeiros anos de vida das crianças são críticos para a aquisição de certos tipos de bactérias, as quais são transmitidas principalmente pelas mães (ROSA et al., 2002).

No entanto, existe pouca informação sobre as alterações periodontais microbiológicas em associação com as alterações clínicas na evolução da gestação e no pós-parto (ADRIAENS et al., 2009). Esta informação deve ser considerada para a caracterização do perfil periodontal de gestantes e puérperas, a fim de estabelecer as necessidades terapêuticas ideais para a manutenção de saúde periodontal que poderá beneficiar a evolução e desfecho da gestação e prevenir a transmissão de micro-organismos periodontopatogênicos de mães para seus filhos.

Bactérias periodontais podem ser identificadas por meio de métodos de cultura e de análise molecular como, por exemplo, a reação da polimerase em cadeia (PCR), hibridização DNA-DNA e a técnica de da hibridização *in situ* fluorescente (FISH – *Fluorescence in situ hybridization*). A técnica de FISH é definida como uma ferramenta da biologia molecular que utiliza marcadores fluorescentes e permite a identificação filogenética de bactérias sem a necessidade de cultivo prévio (DEL'DUCA; CÉSAR, 2007; MOTER; GÖBEL, 2000; PERNTHALER; PERNTHALER; AMANN, 2002) e combina a precisão da genética molecular com as informações visuais da microscopia, permitindo a identificação, visualização e quantificação de células microbianas (MOTER; GÖBEL, 2000).

Frente ao exposto, o presente estudo tem como objetivo avaliar os parâmetros periodontais clínicos e microbiológicos, por meio da técnica de FISH, de mulheres durante a gestação e no pós-parto.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para melhor compreensão do tema proposto, este capítulo se propõe a revisar a literatura acerca de alguns aspectos relacionados à doença periodontal e sua microbiologia na gestante e a relação desta com os desfechos adversos na gestação, bem como da utilização da técnica de FISH para diagnóstico de micro-organismos que colonizam o periodonto.

2.1 DOENÇA PERIODONTAL NA GESTAÇÃO

As doenças periodontais (gengivite e periodontite) são doenças infecciosas que resultam na inflamação dos tecidos de suporte dos dentes, podendo levar à perda progressiva de tecido conjuntivo de inserção e osso alveolar (FLEMMIG, 1999).

Clinicamente, a doença periodontal é caracterizada por alteração na cor e na textura da gengiva e por um aumento na tendência ao sangramento à sondagem no sulco gengival/bolsa periodontal. Além disso, os tecidos periodontais podem apresentar uma redução na resistência à sondagem (aumento da profundidade clínica da bolsa) e/ou recessão gengival. Estágios mais avançados da doença estão frequentemente associados à presença de mobilidade dentária, migração ou apinhamento dentário (LINDHE; KARRING; LANG, 2005).

De acordo Kinane (2001), a gengivite é caracterizada por uma condição inflamatória dos tecidos moles ao redor do dente e ocorre devido à resposta imune direta à formação de biofilme bacteriano no dente. Ela pode ser modificada por vários fatores, como fumo, uso de algumas drogas ou alterações hormonais. A periodontite ocorre pela evolução da gengivite e também é influenciada por respostas imune e inflamatória individuais. Na periodontite ocorre a destruição das estruturas de suporte dos dentes, incluindo ligamento periodontal, osso e tecidos moles.

A doença periodontal é considerada uma das principais doenças crônicas que atingem os seres humanos, afetando uma alta proporção da população em todo

mundo (LORENCINI et al., 2009; OFFENBACHER et al., 2001). No Brasil, o levantamento epidemiológico nacional Projeto SB Brasil 2003 (BRASIL, 2004) determinou a prevalência de doença periodontal por meio do Índice Periodontal Comunitário (CPI) e demonstrou que a porcentagem de pessoas com algum problema periodontal nas faixas etárias de 15 a 19, 35 a 44 e 65 a 74 anos foi de, respectivamente 53,8%, 78,1% e 92,1%. O número médio de sextantes afetados e a respectiva proporção em cada sextante do CPI, considerando a população adulta (35 a 44 anos) da Região Sudeste foram: sadio ($n=2,2$ – 36,54%); sangramento ($n=0,6$ – 9,97%); cálculo ($n=1,25$ – 20,76); bolsa de 4 a 5 mm ($n=0,21$ – 3,49%); bolsa de 6 mm ou mais ($n=0,05$ – 0,83%).

A patogênese da doença periodontal inclui a participação de vários fatores, os quais podem influenciar o início, a progressão e as características clínicas da doença, assim como a resposta ao tratamento. Estes fatores correspondem à especificidade e patogenicidade da microbiota envolvida, resposta imune-inflamatória do hospedeiro, fatores de risco ambientais e adquiridos, características do metabolismo do tecido conjuntivo e do tecido ósseo alveolar, assim como fatores de risco genéticos (LINDHE; KARRING; LANG, 2005). A etiopatogenia da doença periodontal é resultante de um processo multifatorial em que a presença de micro-organismos específicos é essencial, mas não suficiente para o desencadeamento da doença (ALBANDAR, 2002; OFFENBACHER, 1996). O dano periodontal somente ocorre se houver um desequilíbrio entre a agressão microbiana e a resposta do hospedeiro. Portanto, qualquer alteração capaz de modificar o equilíbrio fisiológico do hospedeiro também é capaz de modificar a extensão e o curso da doença periodontal, assim como a resposta ao tratamento (OFFENBACHER, 1996; OFFENBACHER et al., 1996).

Fatores de risco próprios ou adquiridos, como características transmitidas geneticamente, diabetes ou tabagismo podem modificar a susceptibilidade à doença, a microbiota do biofilme, a apresentação clínica da doença periodontal, a progressão da doença e a resposta ao tratamento (LINDHE; KARRING; LANG, 2005; PAGE et al., 1997).

As gestantes parecem particularmente suscetíveis ao comprometimento periodontal, em maior ou menor grau. Os estudos revisados demonstraram que a prevalência da doença periodontal em gestantes variou de 10,1% (RAMOS et al., 2006) a 100% (ROSELL; MONTANDON-POMPEU; VALSECKI JÚNIOR, 1999). Em

Juiz de Fora, MG, gestantes usuárias do serviço público apresentaram prevalência de 87,8% de doença periodontal, sendo que em 14,4% da amostra registrou-se doença periodontal grave com presença de bolsa periodontal ≥ 4 mm (OLIVEIRA, 2009).

Durante a gestação, hormônios sexuais esteroidais mantêm-se elevados devido à contínua produção destes pelo corpo lúteo. Até o final do terceiro trimestre gestacional, a progesterona e o estrógeno alcançam, respectivamente, um pico plasmático de 100 e 6 ng/ml, o que representa uma quantidade 30 (progesterona) e 10 (estrógeno) vezes maior em comparação com os níveis observados durante o ciclo menstrual (GÜNCÜ; TÖZÜM; CAGLAYAN, 2005; LINDHE; KARRING; LANG, 2005; MARIOTTI, 1994).

Na gengiva e em outros tecidos intrabucais, o aumento da progesterona, mais especificamente que do estrógeno, resulta em maior permeabilidade vascular, com conseqüente edema e aumento nos níveis de fluido gengival. A produção de prostaglandinas (PG) também é estimulada e potencializa a inflamação gengival e a perda de queratinização do epitélio gengival, além de aumentar a proliferação de fibroblastos e alterar a quimiotaxia e a capacidade fagocitária dos neutrófilos (AMAR; CHUNG, 1994; MARKOU et al., 2009).

Além das alterações hormonais, a maior suscetibilidade a infecções (como a infecção periodontal) experimentada durante a gestação ocorre devido às alterações no sistema imune e pode ser explicada pela supressão da atividade de células T, aumento da quimiotaxia e fagocitose de neutrófilos, alteração da resposta linfocitária e diminuição da produção de anticorpos e, até mesmo, pelo estresse crônico materno (MARKOU et al., 2009).

Os efeitos fisiológicos diretos no tecido periodontal decorrentes do aumento nos níveis de estrógeno e progesterona podem levar a modificações na ecologia subgengival e parecem estar associados ao aumento do crescimento de certas bactérias Gram-negativas na cavidade bucal (GÜNCÜ; TÖZÜM; CAGLAYAN, 2005; KORNMAN; LOESCHE, 1980; MURAMATSU; TAKAESU, 1994; NEWMAN, 1985; YOKOYAMA et al., 2008). Altos níveis de progesterona durante a gestação, também interferem no desenvolvimento da inflamação localizada, diminuindo a regulação da produção de interleucina-6 (IL-6), o que torna os tecidos gengivais menos resistentes às inflamações causadas pelas bactérias (LAPP; THOMAS; LEWIS, 1995). Segundo Priedols (2006), estes fatores hormonais que afetam o epitélio e aumentam a

permeabilidade vascular podem contribuir para uma resposta exagerada ao biofilme bacteriano durante a gestação.

2.2 MICROBIOLOGIA DA DOENÇA PERIODONTAL

Das centenas de micro-organismos isolados na microbiota subgengival estima-se que apenas cerca de 10 a 20 espécies participam da patogenicidade e da progressão da doença periodontal (SLOTS, 1986b; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1994). Incluem-se entre estes: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium nucleatum* (GROSSI et al., 1994; GROSSI et al., 1995; SLOTS, 1986a; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). Dentre estas espécies o *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* têm mostrado maior relevância etiológica no início e progressão das lesões periodontais destrutivas, raramente sendo encontrados em sítios saudáveis (SANZ et al., 2004; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005; YANO-HIGUCHI et al., 2000).

O *A. actinomycetemcomitans*, anteriormente denominado *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (NORSKOV-LAURITSEN; KILIAN, 2006), é um bastonete pequeno, de terminação arredondada, Gram-negativo, imóvel e sacarolítico. Este micro-organismo apresenta a habilidade de invadir células epiteliais e endoteliais e de produzir uma potente leucotoxina, cuja presença está associada a uma maior virulência (DAVEY; COSTERTON, 2006; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). Além disso, pode induzir a morte celular por apoptose (ARAKAWA et al., 2000). São encontrados em proporções elevadas em lesões de periodontite juvenil localizada e em periodontite do adulto. Em sítios saudáveis, de gengivite ou em indivíduos edentados, o *A. actinomycetemcomitans* é encontrado em baixas proporções (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

O *T. forsythia*, anteriormente denominado *Bacteroides forsythus* ou *Tannerella forsythensis* (SAKAMOTO et al., 2002), é um micro-organismo Gram-negativo e anaeróbio extremamente fastidioso, o que dificulta sua detecção por métodos cultura-dependentes. Sua presença pode ser associada à periodontite crônica e

também à forma agressiva da doença (TANNER; IZARD, 2006). Indivíduos que apresentam este micro-organismo são mais suscetíveis à perda óssea, perda de inserção e perda dentária (MACHTEI et al., 1999).

O *Campylobacter rectus* é um vibrião móvel, Gram-negativo, que tem sido associado à doença periodontal (MACUCH; TANNER, 2000; RAMS; FEIK; SLOTS, 1993; YOKOYAMA et al., 2005; YOKOYAMA et al., 2008). Este micro-organismo é encontrado em maior número em sítios doentes, exibindo destruição periodontal ativa ou progredindo de saúde à doença periodontal (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). O *C. rectus* produz vários fatores de virulência, inclusive uma leucotoxina, que podem aumentar a expressão de vários mediadores inflamatórios pelas células do hospedeiro (GILLESPIE et al., 1993; YOKOYAMA et al., 2005; YOKOYAMA et al., 2008).

O *P. gingivalis* é um bastonete Gram-negativo imóvel, anaeróbico obrigatório, que requer ferro, sobrevivendo apenas em sítios com provisão nutricional complexa e tensão reduzida de oxigênio, como a região subgengival. A colonização por este micro-organismo resulta em lesão tecidual, através da produção de uma variedade de fatores de virulência, como adesinas, hemaglutininas e proteinases, e através da desregulação dos sistemas imune e inflamatório do hospedeiro (LAMONT; JENKINSON, 1998; LAMONT; JENKINSON, 2000). São encontrados com frequência em proporções elevadas em lesões de periodontite ativamente progressivas e sua presença indica um risco aumentado de perda óssea alveolar e perda do nível de inserção (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

As espiroquetas são micro-organismos altamente móveis, Gram-negativos, anaeróbicos, que são muito comuns em bolsas periodontais (SAKAMOTO; UMEDA; BENNO, 2005; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). Dentre os treponemas orais cultiváveis, o *T. denticola* é frequentemente detectado em pacientes com periodontite. As espiroquetas podem representar 50% dos micro-organismos detectados no biofilme subgengival de pacientes acometidos por gengivite úlcero-necrosante aguda e periodontite crônica do adulto, sendo detectadas em apenas 1% dos sítios saudáveis (CHAN; MCLAUGHLIN, 2000; RIVIERE et al., 1992; SAKAMOTO; UMEDA; BENNO, 2005). Tem sido demonstrado que o *T. denticola* se liga aos fibroblastos humanos, proteínas e outros substratos por mecanismos específicos. A ligação das espiroquetas aos fibroblastos gengivais humanos resulta em toxicidade e morte celular devido a enzimas e outras proteínas. Além disso, o *T.*

denticola tem a capacidade de se locomover em fluidos viscosos, o que, aparentemente, lhe confere vantagem ecológica uma vez que possibilita sua penetração nos sulcos gengivais e nos tecidos adjacentes (CHAN; MCLAUGHLIN, 2000).

O *F. nucleatum* é um bastonete fusiforme, anaeróbico, Gram-negativo, que é reconhecido como parte da microbiota subgengival há mais de 100 anos (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). É um micro-organismo frequentemente isolado de sítios com manifestações de doença periodontal e é potencialmente patogênico devido a sua produção de irritantes teciduais, seu sinergismo com outras bactérias em infecções mistas e sua habilidade de formar agregados com outros patógenos da doença periodontal e formar uma ponte entre colonizadores iniciais e tardios da superfície dentária por meio de mediadores de coagregação, e por modificar o ambiente, tornando-o adequado a outros anaeróbios obrigatórios (BOLSTAD; JENSEN; BAKKEN, 1996; SHARMA et al., 2005).

O *Prevotella intermedia sensu lato* (anteriormente denominado *Bacteroides intermedius*) é um bastonete Gram-negativo, anaeróbio, que tem sido associado tanto a infecções bucais quanto a extrabucais, e tem sido encontrado também como parte da microbiota sadia (GUILLOT; MOUTON, 1997). Este grupo foi dividido em duas espécies, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*, que apresentam 94% de similaridade no que se refere à estrutura do DNA (ASHIMOTO et al., 1996; SHAH; GHARBIA, 1992). Alguns estudos indicam que o *P. intermedia* é mais comum em sítios com doença periodontal enquanto o *P. nigrescens* predomina em sítios saudáveis. Outros autores, entretanto, sugerem que *P. nigrescens* é mais comum em crianças, gestantes e em indivíduos com doença periodontal e/ou infecções endodônticas (GÜRSOY et al., 2009; KUHNERT et al., 2002; PEARCE et al., 2000).

Socransky et al. (1998) empregando a técnica de hibridização DNA-DNA, agruparam algumas espécies bacterianas, obtidas de biofilme subgengival de 185 indivíduos adultos, em complexos de acordo com sua relação com a doença periodontal. As associações foram investigadas entre as espécies por meio de técnicas de análise de grupo e de comunidade. Cinco complexos principais foram observados. Os micro-organismos do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*) são encontrados em maior número em lesões de adultos com periodontite, particularmente em sítios com bolsas periodontais profundas, com presença de sangramento à sondagem e lesões mais avançadas. Os micro-

organismos do complexo laranja (*F. nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *P. micros*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Streptococcus constellatus*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* e *C. rectus*) foram fortemente associados uns com os outros e com o complexo vermelho, e também estão associados com o aumento da profundidade da bolsa periodontal. Outros complexos descritos foram: complexo verde (*Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga* sp, *Campylobacter concisus*, *A. actinomycetemcomitans* sorotipo A); complexo amarelo (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus oralis*); e complexo púrpura (*Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*), que parecem colonizar a superfície dentária e proliferar em estágios iniciais do desenvolvimento do biofilme dental. O *Actinomyces viscosus*, *Selenomonas noxia* e *A. actinomycetemcomitans* sorotipo B não foram agrupados em nenhum complexo.

A sequência de colonização por estes complexos pode determinar o surgimento de gengivite. A colonização inicial parece envolver membros dos complexos amarelo, verde e púrpura. Isto conduz à sucessão autogênica na qual os membros dos complexos laranja e vermelho se tornam dominantes. O aumento na proporção destes micro-organismos, hipoteticamente, induz mudanças ambientais que levam à manifestação clínica de gengivite (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

Existe um consenso de que a composição do biofilme dental contribui para o início e a progressão da periodontite uma vez que serão as espécies bacterianas presentes que determinarão o nível de destruição tecidual. As espécies do complexo vermelho e *A. actinomycetemcomitans* (no caso da periodontite agressiva), são consideradas mais virulentas e com maior poder de destruição do que qualquer outra espécie do biofilme. Isto é resultado das várias habilidades que estas espécies apresentam, como capacidade de colonização do sítio subgengival, de invasão, de produção de proteases e exotoxinas e de interferência na resposta imunológica do hospedeiro (FENG; WEINBERG, 2006).

Em 2008, Haffajee et al., com análises similares ao estudo de Socransky et al. (1998), examinaram a relação entre as bactérias de biofilme supragengival. Amostras de biofilme supragengival de 187 indivíduos foram obtidas no *baseline* do estudo. Cinquenta e cinco voluntários forneceram amostra de biofilme supragengival 1-7 dias após limpeza profissional e 93 voluntários, 3-24 meses após a terapia. Seis complexos foram formados em relação às amostras do *baseline*, semelhantes aos encontrados em amostras de biofilme subgengival, com algumas pequenas

diferenças. Na avaliação em curto prazo (1-7 dias), a estrutura da comunidade foi imperfeitamente desenvolvida, sugerindo a necessidade de maior tempo para a formação de um biofilme maduro típico. Em longo prazo (3-24 meses), a estrutura da comunidade bacteriana foi re-estruturada, embora com menores números de espécies de micro-organismos do que antes do tratamento. A relação entre a composição da microbiota das amostras de biofilme supragengival e os parâmetros clínicos de inflamação foi forte e muitas espécies estavam em número significativamente elevado em sítios que exibiam vermelhidão gengival ou sangramento à sondagem. As espécies dos complexos vermelho e laranja foram as mais aumentadas nas adjacências de sítios inflamados e também de sítios com presença de bolsa periodontal profunda.

2.3 MICROBIOTA PERIODONTAL EM GESTANTES

Kornman e Loesche (1980) parem ter sido os primeiros pesquisadores a investigar a microbiota oral em gestantes. Biofilmes subgengival e supragengival de 20 mulheres sem doença periodontal, durante a gestação e no pós-parto foram coletados mensalmente e foram analisados pelo método de cultura. Um grupo controle de 11 mulheres não gestantes também fez parte do estudo. Os níveis plasmáticos de estradiol e progesterona também foram avaliados. O número de sítios com sangramento gengival, o índice gengival e o índice de placa foram avaliados em cada exame de coleta de biofilme. No grupo de gestantes, a gengivite aumentou significativamente entre as 13^a e 28^a semanas de gestação. Houve também um aumento dos micro-organismos anaeróbios e aeróbios em um estágio inicial da gestação (13^a a 16^a semanas) e eles mantiveram-se altos até o final da mesma. O único micro-organismo que apresentou um aumento significativo durante a gestação foi o *P. intermedia* (anteriormente denominado *Bacteroides melaninogenicus ss. Intermedius*) e este aumento mostrou-se associado com os níveis sistêmicos de estradiol e progesterona. Nenhuma alteração foi observada em relação aos parâmetros clínicos e microbiológicos no grupo controle. Desta forma, o estudo sugeriu que a gestação e hormônios esteroidais específicos são capazes de alterar a microbiota e induzirem alterações na ecologia subgengival.

Jensen, Liljemark e Bloomquist (1981) avaliaram 104 mulheres, sendo 54 gestantes, 27 não gestantes e 23 não gestantes em uso de contraceptivo, em relação a alterações periodontais clínicas (índice gengival, fluxo de fluido gengival e profundidade de bolsa periodontal), e microbiológicas (presença de espécies de *Fusobacterium* e *Bacteroides*). Foi observado que as gestantes, em comparação com os outros grupos, apresentaram um aumento da gengivite e do sangramento gengival sem aumento de índices de biofilme. Além disso, os autores relacionaram esta ocorrência com um maior aumento na proporção de espécies de *Bacteroides* em gestantes quando comparado com não gestantes.

Em um estudo laboratorial realizado com micro-organismos isolados do biofilme subgengival de gestantes, Kornman e Loesche (1982) relataram que hormônios esteroidais (estradiol e progesterona) parecem ter a capacidade de alterar a microbiota subgengival, influenciando diretamente no metabolismo do *Prevotella intermedia*.

Jonsson, Howland e Bowden (1988) avaliaram a relação entre os níveis de hormônios esteroidais na saliva, os parâmetros clínicos de saúde gengival e a proporção de *P. intermedia* de determinadas áreas subgengivais de 90 indivíduos: homens (n=30), gestantes (n=30) e não gestantes (n=30). A análise microbiológica foi realizada em sete gestantes no segundo trimestre de gestação, sete no terceiro trimestre, 14 mulheres não gestantes e em nove homens. Os níveis do micro-organismos estudados foram avaliados pelo método de cultura anaeróbia, determinando-se o número de unidades formadoras de colônia (UFC) para cada um deles. Os resultados deste estudo demonstraram que não houve diferença entre o grupo de gestantes e não gestantes em relação aos parâmetros clínicos avaliados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a contagem total de bactérias entre os três grupos, entretanto, o grupo de homens apresentou proporções significativamente maiores de bactérias Gram-negativas (*P. intermedia*) que os demais grupos. Os resultados indicaram que um aumento dos níveis hormonais ou altos níveis hormonais salivares não causam doença periodontal mais grave nem provocam o aumento de contagem de *P. intermedia* no biofilme subgengival de gestantes.

Em 1994, Muramatsu e Takaesu investigaram a relação entre o estado de saúde bucal, a microbiota subgengival e a concentração de hormônios sexuais na saliva de gestantes. Trinta e nove mulheres (19 gestantes, oito mulheres na 5ª

semanas após o parto e 12 não gestantes) fizeram parte do estudo. O número de sítios de sangramento à sondagem aumentou concomitantemente com o aumento na porcentagem de *P. intermedia*, do terceiro ao quinto mês de gestação. O percentual de *P. intermedia* aumentou com o aumento dos hormônios na saliva nos quatro primeiros meses de gestação. A concentração de hormônios na saliva atingiu o pico no nono mês de gestação, entretanto, a proporção de *P. intermedia* decresceu. A inflamação gengival foi maior no grupo de gestantes, no qual 15% de *P. intermedia* do total de UFC foram detectada, sendo que a gravidade da inflamação também apresentou uma tendência ao aumento.

Yokoyama et al. (2005), em um estudo *in vitro*, confirmaram a hipótese de que os hormônios sexuais femininos (estradiol e progesterona), devido ao seu efeito sobre o *C. rectus* e os fibroblastos gengivais humanos, podem contribuir para a progressão da doença periodontal durante a gestação. Foi observado que o crescimento do *C. rectus* foi significativamente exacerbado pela incorporação tanto do estradiol quanto da progesterona no meio de cultura. Além disso, a produção de fator de crescimento endotelial vascular, IL-6 e IL-8 pelos fibroblastos gengivais humanos aumentou após estímulo com estradiol e progesterona, em concentrações comparáveis àquelas presentes no plasma de gestantes.

Yokoyama et al. (2008), avaliaram a presença de cinco periodontopatógenos (*C. rectus*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* e *P. intermedia*) na saliva de 22 gestantes e de 15 não gestantes pela técnica da PCR. A profundidade de bolsa periodontal e o sangramento à sondagem foram registrados. A concentração de estradiol na saliva das mulheres também foi avaliada. Os autores concluíram que os níveis de *C. rectus* foram positivamente correlacionados com a concentração de estradiol na saliva, com a porcentagem de sítios com profundidade de bolsa periodontal igual a 4 mm e a presença de sangramento à sondagem. Estes resultados estão de acordo com o estudo prévio dos mesmos autores (YOKOYAMA et al., 2005) e sugerem que a população de *C. rectus* na microbiota de gestantes pode contribuir para a progressão da doença periodontal na gestação.

Adriaens et al. (2009) investigaram as alterações microbiológicas durante a gestação (12^a, 28^a e 32^a semanas) e 4 a 6 semanas após o parto em 20 mulheres. A coleta de biofilme subgengival foi realizada por meio de inserção de cone de papel por 15 segundos na superfície mésio-vestibular dos primeiros molares permanentes. Trinta e sete espécies de bactérias foram avaliadas pela técnica de hibridação DNA-

DNA. Como resultado, observou-se uma redução no número de 17 bactérias, entre as 37 avaliadas, entre a 12^a semana de gestação e o pós parto e não houve diferença entre a 12^a semana e a 28^a semana de gestação. O nível subgingival de bactérias associadas à doença periodontal (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*) não sofreu alteração. As contagens de *P. gingivalis* e *T. forsythia* na 12^a semana de gestação estavam associadas com gengivite ($P < 0,001$). Somente a contagem de *N. mucosa* aumentou.

Em 2009, Gürsoy et al. pretenderam obter informações atualizadas sobre o envolvimento da *P. intermedia* e *P. nigrescens* na gengivite gestacional. Amostras de saliva estimulada e biofilme subgingival foram coletadas de 30 gestantes (três momentos durante a gestação e dois momentos após o parto) e de 24 mulheres não gestantes (três momentos de avaliação). Foram preliminarmente identificados como *P. intermedia sensu lato* 2628 isolados, baseados em testes fenotípicos. Uma identificação posterior foi realizada usando a PCR. A porcentagem de *P. intermedia sensu lato* no biofilme alcançou seu pico no segundo trimestre da gestação (6,3%), enquanto a proporção na saliva permaneceu estável no período de acompanhamento em ambos os grupos. Além disso, durante o segundo trimestre, o número médio de *P. intermedia sensu lato* no biofilme aumentou com o aumento dos sinais de gengivite gestacional, e posteriormente ambos decresceram. Após o parto, a inflamação gengival continuou reduzindo enquanto o número de *P. intermedia sensu lato* aumentou transitoriamente tanto no biofilme quanto na saliva. Neste estudo, dos 1817 isolados no grupo de gestantes, a maioria (95,3%) foi de *P. nigrescens* e 2,5%, de *P. intermedia*. No grupo das não gestantes, dos 811 isolados, 94,2% foram de *P. nigrescens* e 5,5%, de *P. intermedia*. Os autores concluíram que o *P. nigrescens* foi encontrado com frequência na cavidade bucal de gestantes com sinal de gengivite, mas ausência de periodontite, ao contrário da maior frequência de *P. intermedia* encontrada em outros estudos citados anteriormente.

Em 2010, Carrillo-de Albornoz et al. testaram a hipótese de que a gestação induz alterações no biofilme subgingival, e estas são responsáveis pelo agravamento da inflamação gengival que ocorre durante este período. Foram avaliadas 42 gestantes sem doença periodontal em três momentos durante a gestação (primeiro, segundo e terceiro trimestres) e três meses após o parto. Vinte gestantes foram incluídas como grupo controle e foram avaliadas duas vezes, com intervalo de seis meses. Em cada exame, foram coletados dados clínicos e amostra

de biofilme subgengival para a análise microbiológica, que foi realizada pela técnica de cultura. A proporção dos periodontopatógenos avaliados não sofreu alterações durante a gestação, entretanto foram observadas diferenças estatisticamente significativas em todos os micro-organismos após o parto. A presença de *P. gingivalis* determinou um aumento na inflamação gengival não relacionada à placa bacteriana. Foram observadas correlações entre os níveis hormonais e a presença de *P. gingivalis* e *P. intermedia*. Os autores concluíram que as gestantes tendem a apresentar um perfil bacteriano mais patogênico, em comparação com o pós-parto. Uma inflamação gengival mais grave foi observada em gestantes que apresentaram certos periodontopatógenos acima do limiar de cultura desde o início da gestação, sugerindo que a exacerbação da inflamação gengival observada em algumas mulheres pode ser relacionada, em parte, com um perfil microbiológico mais patogênico.

Frente ao exposto, observou-se uma deficiência de estudos em relação à microbiota oral de gestantes. Por outro lado, tem sido dada atenção à associação entre esta microbiota e desfechos adversos da gestação. Sendo assim, estes estudos serão brevemente expostos.

2.4 MICROBITOTA PERIODONTAL E DESFECHOS ADVERSOS NA GESTAÇÃO

Em 1994, Collins et al. sugeriram a hipótese de que infecções bucais, como a doença periodontal, poderiam atuar como fonte de bactérias e mediadores inflamatórios, e se disseminar sistemicamente para a unidade feto placentária, através da circulação sanguínea, e induzir complicações na gestação. Neste estudo laboratorial, a bactéria *P. gingivalis* foi injetada em hamsters grávidas, e os autores observaram que a infecção por este periodontopatógeno resultou em fetos menores e aumento dos mediadores inflamatórios (TNF- α e PGE₂) no local da infecção e no líquido amniótico.

O estudo de Offenbacher et al. (1998), analisando fluido de sulco gengival de 44 mulheres até três dias após o parto por meio de sondas de DNA, detectou, em maiores níveis, quatro micro-organismos associados com biofilme maduro e periodontite progressiva em mulheres que tiveram recém-nascidos prematuros e de

baixo peso em comparação com aquelas que tiveram recém-nascidos a termo e com peso normal: *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *T. denticola*.

Mitchell-Lewis et al. (2001) avaliaram amostras de biofilme subgengival de 145 mulheres pela técnica de hibridização de DNA em relação a 12 espécies de bactérias. Nenhuma diferença na situação periodontal clínica foi observada entre mães de recém-nascidos prematuros e mães de recém-nascidos a termo. Entretanto, os autores observaram que mães de recém-nascidos prematuros e de baixo peso apresentavam, durante a gestação, níveis significativamente mais altos de algumas bactérias que colonizam o periodonto, tais como *T. forsythia*, *C. rectus* e *P. nigrescens*.

Em 2001, Madianos et al. (2001) avaliaram a infecção periodontal em gestantes, pela técnica de hibridização DNA-DNA, para identificar a presença de 15 periodontopatógenos no biofilme subgengival de 400 mulheres até 48 horas após o parto, sendo 289 mulheres incluídas no grupo a termo e 101, incluídas no grupo pré-termo. Além disso, foi realizada coleta de soro materno (IgG materna) e soro do cordão umbilical (IgM fetal). Os principais micro-organismos avaliados foram aqueles comumente associados à doença periodontal, convencionalmente denominados por Socransky et al. (1998) de “complexo laranja” (*C. rectus*, *F. nucleatum*, *P. micros*, *P. nigrescens* e *P. intermedia*) e “complexo vermelho” (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*). A prevalência de oito periodontopatógenos foi similar entre os dois grupos avaliados. Houve uma prevalência 2,9 vezes maior de IgM soropositivo para um ou mais micro-organismos dos complexos laranja e vermelho entre os recém-nascidos do grupo pré-termo ($P=0,0015$). A prevalência de IgM fetal positiva para *C. rectus* foi significativamente maior nos pré-termos, comparados aos recém-nascidos a termo (20% versus 6,3%, $P=0,0002$), assim como em relação a *P. intermedia* (8,8% versus 1,1%, $P=0,0003$). Uma falta de anticorpos IgG maternos aos organismos do complexo vermelho foi associada ao aumento da prematuridade, em concordância com o conceito de que anticorpos maternos protegem o feto de exposições e consequente prematuridade. Assim, os autores concluíram que a infecção periodontal materna com ausência de anticorpos maternos protetores está associada com a disseminação sistêmica de micro-organismos orais, resultando em prematuridade. Além disso, a alta prevalência de IgM fetal elevada para *C. rectus* entre os recém-nascidos prematuros sugerem a possibilidade que este patógeno,

especificamente, pode ser indicado como um agente infeccioso primário à prematuridade.

Hasegawa et al. (2003) avaliaram fluido de sulco gengival de 88 parturientes pela técnica do PCR e relataram altos níveis de *T. forsythia* nas mulheres que tiveram parto prematuro quando comparadas com as de parto a termo.

Com o propósito de avaliar a possível associação entre a infecção periodontal e nascimentos prematuros de baixo peso através de dados clínicos e microbiológicos no pós-parto, Buduneli et al. (2005b), em um estudo caso-controle do qual participaram 181 mulheres, realizaram avaliação microbiológica de biofilme subgengival pela técnica de hibridização DNA-DNA. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto aos parâmetros periodontais clínicos adotados. Os resultados demonstraram a importância do *Peptostreptococcus micros* e do *C. rectus* no aumento do risco de nascimentos prematuros e de baixo peso, e da *P. nigrescens* e do *A. actinomycetemcomitans* na redução deste desfecho.

Dortbudak et al. (2005) realizaram exame clínico periodontal (sangramento gengival e profundidade de bolsa periodontal), coleta de fluido gengival com cones de papel por 10 segundos e coleta de líquido amniótico por amniocentese em 36 gestantes entre a 15^a e 20^a semanas de gestação. Após o acompanhamento destas mulheres até o final da gestação, observou-se que 83% das seis gestantes que tiveram parto prematuro apresentavam doença periodontal, comparado com 20% das 30 gestantes que tiveram parto a termo ($P < 0,001$). Foi observada presença de bactérias dos complexos vermelho e laranja em 18% das mulheres com gestação normal e 100% das com parto prematuro ($P < 0,001$) e houve também maiores contagens de UFC no grupo pré-termo. Os níveis de IL-6 e PGE₂ no líquido amniótico foram maiores nos casos de prematuros e foram correlacionados com as UFC das amostras de biofilme subgengival. Os autores sugeriram que a doença periodontal pode induzir uma resposta primária do hospedeiro nos tecidos corioamnióticos, levando a nascimentos prematuros.

Jarjoura et al. (2005), em um estudo caso-controle, investigaram a relação entre o nascimento prematuro e parâmetros periodontais clínicos, microbiológicos e imunológicos. Exame periodontal, coleta de biofilme subgengival e coleta de sangue foram realizados, 48h após o parto, em 83 mulheres com parto prematuro (grupo caso) e 120 mulheres com parto a termo (grupo controle). A análise de 12 microorganismos subgengivais foi realizada pela técnica de hibridização DNA-DNA. As

mulheres do grupo caso apresentaram maior prevalência de periodontite (30,1% versus 17,5%, $P=0,027$) e de perda de inserção (1,7 mm versus 1,5 mm, $P=0,003$), em comparação com as do grupo controle. Entretanto, nenhuma diferença em relação aos níveis de micro-organismos e anticorpos séricos foi encontrada.

Skuldbol et al. (2006), em um estudo caso-controle, avaliaram a diferença da condição periodontal e da presença de bactérias subgengivais de mulheres escandinavas que tiveram recém-nascidos prematuros (grupo caso; $n=21$) e mulheres que tiveram recém-nascidos a termo (grupo controle; $n=33$). A presença de 18 bactérias que colonizam o periodonto foi avaliada em 31 mulheres, sendo 16 do grupo caso e 15 do grupo controle, após coleta de fluido de sulco gengival com cone de papel por 10 segundos e análise pela técnica de hibridização DNA-DNA. Não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos em relação aos parâmetros clínicos avaliados (índice de biofilme, sangramento à sondagem, profundidade de bolsa periodontal). Diferenças significativas foram encontradas em relação à presença de *T. forsythensis*, *T. denticola*, *P. micros*, *Streptococcus intermedius*, *S. oralis*, *S. sanguis* e *Capnocytophaga ochracea*. Entretanto, quando os sítios com $> 10^5$ de bactérias foram definidos como altamente colonizados, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Sendo assim, não foi encontrada relação entre parto prematuro e doença periodontal neste estudo.

Um estudo caso-controle foi desenvolvido por Úrban et al. (2006) para avaliar a existência de uma associação entre a condição clínica periodontal de 161 puérperas, a composição da microbiota periodontal e o nascimento prematuro. Os resultados demonstraram profundidade de bolsa periodontal significativamente maior ($P=0,001$) em mães de recém-nascidos prematuros e de baixo peso (caso) em comparação com as mães de recém-nascidos a termo e de peso normal (controle). Houve associação significativa entre o número de bactérias anaeróbias e a presença de periodontite. As contagens de patógenos periodontais estavam significativamente mais altas entre as mães do grupo caso ($P=0,001$). Os dados revelaram uma possível associação entre a periodontite, causada por bactérias anaeróbias Gram-negativas (*T. forsythia*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, *Fingoldia magna*, *P. gingivalis*) e nascimentos prematuros de baixo peso.

O estudo caso-controle de Lin et al. (2007) avaliou a presença de periodontopatógenos no biofilme subgengival de 31 mulheres utilizando sondas de DNA. Os autores observaram que os níveis de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*,

P. intermedia, *P. nigrescens*, *C. rectus* e *F. nucleatum* tenderam a ser maior na 22^a semana de gestação no grupo de mulheres que tiveram parto pré-termo em comparação com aquelas de parto a termo. Além disso, observou-se que o número destes micro-organismos aumentou, pelo menos em duas vezes, no pós-parto no grupo pré-termo, enquanto os níveis se mantiveram constantes no grupo a termo.

Vettore et al. (2008), em um estudo caso-controle com 116 mulheres após o parto, compararam os parâmetros clínicos e os níveis e proporções de 39 espécies de bactérias em amostras de biofilme subgengival, usando a técnica de hibridização DNA-DNA. Quatro grupos caso de mães de recém-nascidos prematuros e/ou de baixo peso – prematuros (n=40), baixo peso (n=35), prematuros e/ou baixo peso (n=50) e prematuros e baixo peso (n=25) – foram comparados com um grupo controle de mães de recém-nascidos a termo e de peso normal (n=66). Foi encontrado que a média da profundidade de bolsa periodontal foi significativamente maior no grupo controle do que no grupo de mães de recém-nascidos prematuros e de baixo peso. O nível clínico de inserção não apresentou diferença entre os grupos. Também não houve diferença em relação aos micro-organismos estudados. As médias de *Treponema socranskii* foram menores em todos os grupos caso, comparadas com o grupo controle. Foi concluído no estudo que a microbiota periodontal materna e as características clínicas da doença periodontal não estão associadas com o nascimento prematuro e de baixo peso.

2.5 TÉCNICA DE FISH PARA DIAGNÓSTICO DE MICRO-ORGANISMOS QUE COLONIZAM O PERIODONTO

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é definida como uma ferramenta da biologia molecular que utiliza sondas (*probes*) de oligonucleotídeos de RNAr com marcadores fluorescentes e promove a identificação filogenética de bactérias sem a necessidade de cultivo prévio (BOTTARI et al., 2006; DEL'DUCA; CÉZAR, 2007; MOTER; GÖBEL, 2000; PERNTHALER; PERNTHALER; AMANN, 2002). Esta técnica se mostra particularmente útil para a descrição de análises da microbiota habitual e de infecções microbianas mistas na cavidade bucal, por permitir,

simultaneamente, visualização, identificação, enumeração e localização dos micro-organismos (MOTER; GÖBEL, 2000).

A técnica de FISH foi introduzida na bacteriologia em 1988 por Giovannoni et al. (1988), que primeiro usaram sondas radioativas de oligonucleotídeos de RNAr para a detecção microscópica de bactérias. Em 1989, Delong; Wickham e Pace utilizaram sondas de oligonucleotídeos com marcadores fluorescentes, não radioativos, para detecção de células bacterianas. Comparadas com as sondas radioativas, as sondas fluorescentes são mais seguras, oferecem melhor resolução, não necessitam passos adicionais e podem ser marcadas com corantes de diferente comprimento de onda, permitindo detecção de várias sequências com única hibridização (MOTER; GÖBEL, 2000).

Os marcadores corantes utilizados para a técnica de FISH na microbiologia são derivados fluorescentes, derivados *rhodamine* e corantes *cyanine*, como Cy3 e Cy5. Estes últimos têm se mostrado superiores aos corantes clássicos por promoverem coloração mais brilhante e serem estáveis à fotodegradação (MOTER; GÖBEL, 2000).

Em 2000, Moter e Göbel, em um estudo de revisão da literatura, discutiram as aplicações, os aspectos metodológicos, as vantagens, bem como problemas da técnica de FISH. De acordo com os autores, as técnicas de cultura de micro-organismos são muito demoradas, seletivas e não refletem a composição exata de comunidades bacterianas mistas ou a diversidade microbiana em infecções. Já as técnicas moleculares, como a PCR, podem ser usadas com sucesso na microbiologia clínica para detectar micro-organismos de crescimento lento ou de difícil cultivo, entretanto não fornecem informações sobre a morfologia, o número e a distribuição espacial dos mesmos. Com a técnica de FISH é possível combinar a precisão da genética molecular com a informação visual da microscopia, permitindo a visualização e a identificação células microbianas individuais em seu habitat natural ou em tecidos doentes.

Em Odontologia, a análise pelo método de FISH parece particularmente útil, tendo em vista que a cavidade bucal pode ser colonizada por mais de 300 diferentes espécies de bactérias, das quais muitas podem ser de difícil cultivo.

Vários estudos utilizaram esta técnica para o diagnóstico de micro-organismos orais, especialmente os periodontopatogênicos (COLOMBO et al., 2007; GERSDORF et al., 1993; GERSDORF; PELZ; GÖBEL, 1993; GMÜR et al., 2004;

GMÜR; LÜTHI-SCHALLER, 2007; GMÜR e THURNHEER, 2002; MOTER et al., 1998; RUDNEY; CHEN; SEDGEWICK, 2001; RUDNEY; CHEN; SEDGEWICK, 2005; RYLEV; KILIAN, 2008; SUNDE et al., 2003; THURNHEER; GMÜR; GUGGENHEIM, 2004).

Para a realização destes estudos, várias sondas foram utilizadas e desenvolvidas para o diagnóstico de bactérias que colonizam o periodonto. Gersdorf et al. (1993) descreveram uma sonda específica (BFV530) para o diagnóstico de *Tannerella forsythia*. Gersdorf, Pelz e Göbel, (1993), além da identificação de *T. forsythia* pela sonda descrita no estudo anterior, desenvolveram também uma sonda específica (BG32) para identificação de *P. gingivalis*. Moter et al. (1998) desenvolveram sondas de oligonucleotídeos para a identificação de espiroquetas – TRE I, TRE II e TRE III - (*T. denticola*, *T. vincentii*, *T. socranskii*, *T. pectinovorum* e *T. maltophilum*) em pacientes com periodontite. Gmür e Thurnheer (2002) desenvolveram sondas de oligonucleotídeos, marcadas com Cy3 ou 6-FAM na terminação 5', específicas para *P. intermedia* (Pint657 e Pint649), *P. nigrescens* (Pnig657), *P. pallens* (Ppal654 e Ppal186) e *P. denticola* (Pden654). Sunde et al. (2003) utilizaram as sondas TRE I, TRE II e TRE IV para a visualização da maioria dos treponemas orais; a sonda STREP para visualização de *Streptococcus spp*; e desenvolveram, para visualização de *Fusobacterium spp.*, uma sonda gênero específica FUSO, além de sondas espécie específicas para identificação de *A. actinomycetemcomitans* (ACTACT), *T. forsythia* [B(T)AFO], *P. gingivalis* (POGI), *P. intermedia* (PRIN) e *Veillonella parvula* (VEPA). Gmür et al. (2004) utilizaram sondas específicas marcadas com Cy3 ou FAM para identificação de vários patógenos periodontais, entre eles *Fusobacterium nucleatum* (Fnuc133) e *Fusobacterium sp.* (FUS664).

Com o objetivo de facilitar os pesquisadores a encontrarem sondas já desenvolvidas e publicadas e fornecer informações sobre especificidade e cobertura das sondas, o probeBase, um banco de dados na Internet com sondas de oligonucleotídeos RNAr marcadas foi desenvolvido em 2002. Este banco de dados consta de 1258 sondas e oito microarranjos de 266 referências e é frequentemente consultado por pesquisadores em todo mundo (LOY et al., 2007).

Em relação à técnica, Moter e Göbel (2000) apresentaram os seguintes passos: (1) fixação da amostra; (2) preparo da amostra; (3) hibridização com a sonda específica pra detecção das respectivas sequências marcadas; (4) lavagem

para remoção das sondas que não se ligaram; (5) Montagem, visualização e documentação dos resultados.

Vale ressaltar que não foram encontrados estudos que utilizaram a técnica de FISH para a detecção de periodontopatógenos associados à doença periodontal em gestantes, cujos resultados apresentados nos estudos relatados anteriormente não parecem ser conclusivos. Assim, o uso desta técnica molecular, por suas vantagens, adicionaria informações a esta área do conhecimento, justificando a realização desta investigação.

3 HIPÓTESE

A hipótese a ser testada é de que ocorrem alterações nos parâmetros periodontais clínicos e microbiológicos de mulheres acompanhadas em três períodos de variações hormonais fisiológicas (segundo trimestre da gestação, até 48 horas após o parto e oito semanas após o parto).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os parâmetros periodontais clínicos e microbiológicos de mulheres durante a gestação e o pós-parto.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar e comparar as condições periodontais clínicas de gestantes durante o segundo trimestre gestacional e de um grupo controle de não gestantes.
- Determinar e comparar, quantitativamente, a densidade de *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* no biofilme subgengival e na saliva de gestantes no segundo trimestre da gestação e de um grupo controle de não gestantes.
- Determinar e comparar as condições periodontais clínicas de mulheres acompanhadas em três períodos de variações hormonais fisiológicas (segundo trimestre da gestação, até 48 horas após o parto e oito semanas após o parto).
- Determinar e comparar, quantitativamente, a densidade de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* no biofilme subgengival e na saliva de mulheres acompanhadas nos três períodos propostos.

5 METODOLOGIA

5.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Os estudos utilizados foram selecionados por meio de pesquisa bibliográfica de textos indexados na base de dados BIREME, a saber:

- MEDLINE (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*).
- SCIELO (*Scientific Electronic Library Online*).
- Pubmed (Base de dados da *U.S. National Library of Medicine and National Institutes of Health* – Estados Unidos da América).
- Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS).
- Bibliografia Brasileira de Odontologia (BBO).
- Base de Dados da Enfermagem (BDENF).
- Literatura do Caribe em Ciências da Saúde (MEDCARIBE).
- Sistema de Informação da Biblioteca da OMS (WHOLIS).
- Revisões Sistemáticas da Colaboração Cochrane (COCHRANE).

Uma pesquisa bibliográfica de fontes não indexadas (busca ativa) em revistas, livros e trabalhos monográficos foi também realizada.

Na pesquisa bibliográfica, os unitermos, listados abaixo, foram utilizados isoladamente e/ou combinados entre si:

- *Actinobacillus actinomycetemcomitans* – *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
- Bactérias anaeróbias – Bacteria, anaerobic.
- *Campylobacter rectus* – *Campylobacter rectus*.
- Doenças periodontais – Periodontal diseases.
- *Fusobacterium nucleatum* – *Fusobacterium nucleatum*.
- Gestação – Pregnancy.
- Gestantes – Pregnant women.
- Hibridização *in situ* fluorescente – Fluorescence In Situ Hybridization.
- Microbiologia – Microbiology.
- Odontologia – Dentistry.

- Periodontite – Periodontitis.
- *Porphyromonas gingivalis* – *Porphyromonas gingivalis*.
- Prematuro – Infant, premature.
- *Prevotella intermedia* – *Prevotella intermedia*.
- *Prevotella nigrescens* – *Prevotella nigrescens*.
- Recém-nascido de baixo peso – Infant, low birth weight.
- Saúde bucal – Oral health.
- *Treponema denticola* – *Treponema denticola*.

5.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo longitudinal prospectivo consecutivo, com modelo transversal paralelo.

5.3 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo seguiu as normas e diretrizes da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora – CEP/UFJF – nº 262/2008 e nº 130/2010 (Anexos A e B). Cada participante, após ter sido devidamente esclarecida sobre o estudo, consentiu com a sua participação por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). As mulheres participantes do estudo que necessitaram de tratamento odontológico foram encaminhadas ao Projeto Só-Riso – Atenção Materno-Infantil, Projeto de Extensão da Faculdade de Odontologia da UFJF, no qual receberam tratamento em nível de atenção primária, respeitando-se a ordem de inscrição. Os filhos destas mulheres foram também encaminhados para o acompanhamento e tratamento odontológico, em todos os níveis de atenção, dos zero aos três anos de idade, respeitando-se também a ordem de inscrição.

5.4 CASUÍSTICA

Foram convidadas para participar do estudo 50 mulheres no segundo trimestre da gestação (14^a e 24^a semanas de gestação), selecionadas por conveniência, entre as gestantes atendidas pelo Programa de Pré-natal de um hospital público de referência de Juiz de Fora, Minas Gerais (MG). Destas, 31 gestantes aceitaram participar do estudo e puderam ser incluídas, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.

Como grupo controle, foram incluídas 20 mulheres não gestantes, selecionadas por conveniência do Departamento de Triagem da Faculdade de Odontologia da UFJF, MG.

5.4.1 Critérios de inclusão

- Foram incluídas mulheres em bom estado de saúde geral, com idade variando entre 24-32 anos, sem distinção de raça, nível socioeconômico ou escolaridade, com presença de 20 ou mais dentes naturais na arcada e que não estivessem em tratamento odontológico.

5.4.2 Critérios de exclusão

- Foram excluídas as mulheres portadoras de diabetes mellitus, imunossupressão por comprometimento sistêmico, hipertensão arterial, gestação de gêmeos, que apresentaram necessidade de profilaxia antimicrobiana para exame periodontal, que tivessem realizado profilaxia dentária profissional nos últimos seis meses, etilistas, fumantes ou que faziam uso de drogas ilícitas e em uso de medicação anticonvulsivante, ansiolítica, ou antibiótica nos últimos três meses.

5.5 MATERIAIS E MÉTODOS

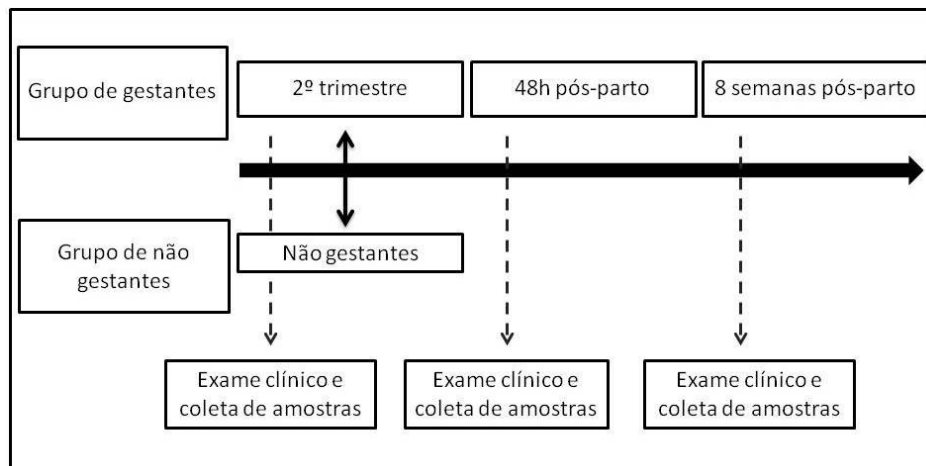
5.5.1 Momentos de avaliação e fluxograma do estudo

As mulheres do grupo de gestantes foram avaliadas em três momentos: no segundo trimestre da gestação (da 14^a semana à 24^a semana), até 48 horas após o parto e oito semanas após o parto.

As mulheres do grupo de não gestantes foram avaliadas em um momento e comparadas com as gestantes no segundo trimestre gestacional.

A figura 1 apresenta o fluxograma do estudo com os grupos e os momentos de avaliação.

Figura 1 – Fluxograma do estudo. As mulheres do grupo de gestantes foram avaliadas em três momentos: segundo trimestre da gestação, 48 horas após o parto e oito semanas após o parto. As mulheres do grupo controle (grupo de não gestantes) foram avaliadas em um momento e comparadas com as gestantes no segundo trimestre de gestação. Os parâmetros clínicos e microbiológicos foram verificados em todos os exames.



Fonte: o autor

5.5.2 Instrumento da coleta de dados

Antes de iniciar cada entrevista, as voluntárias foram informadas sobre os objetivos do estudo, assegurando-se a elas o sigilo de todos os depoimentos e a liberdade de recusar-se a participar da pesquisa a qualquer momento, sem qualquer prejuízo, por meio de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para as todas as mulheres incluídas no estudo, foi preenchido pelo pesquisador um prontuário estruturado (Apêndice B) para o registro dos seguintes dados: dados demográficos e socioeconômicos, segundo critérios da ABEP (ABEP, 2003); inventário de saúde para registro de dados das condições de saúde geral e atendimento odontológico; para as gestantes, dados sobre história da gestação atual e de gestações anteriores, quando houvesse; e dados do exame clínico.

5.5.3 Coleta de dados

A coleta de dados da amostra total foi precedida por um estudo piloto realizado em um hospital público de referência em Juiz de Fora, MG, e no Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Micro-organismos da UFJF, descrito na subseção 5.7.

5.5.3.1 Entrevista

A entrevista com as gestantes foi realizada com o propósito de coletar os dados demográficos, socioeconômicos e relativos à história da gestação atual e/ou anteriores e condição de saúde geral. Os dados das entrevistas foram registrados por um único pesquisador no prontuário elaborado.

5.5.3.2 Exame físico

O exame físico foi realizado por um único pesquisador, previamente treinado e calibrado, sob luz ambiente, com a paciente sentada em cadeira comum ou em leito hospitalar (RAMOS et al., 2006), utilizando-se os seguintes instrumentais/materiais: espelhos planos com cabo, sonda periodontal (PCP-UNC 15, Hu-Friedy[®], Chicago, IL, USA) e compressas de gaze. Todo material foi esterilizado e transportado até o local do exame pelo pesquisador responsável conforme princípios de biossegurança e sem nenhum ônus ao serviço público.

Outro pesquisador, também previamente treinado e calibrado, exerceu a função de anotador.

A condição periodontal foi avaliada com a utilização de quatro indicadores:

- Sangramento à sondagem (SS),
- Presença de cálculo (PC),
- Profundidade de sondagem (PS) e
- Nível clínico de inserção (NCI).

Todos os elementos dentários presentes foram avaliados, exceto os terceiros molares, dentes incompletamente erupcionados e dentes em áreas de lesões cariosas extensas. Foram examinados seis sítios por dente e a presença ou ausência de SS e PC e os maiores escores de PS e NCI foram registrados para cada dente.

A sondagem dos dentes foi realizada conforme recomendação de Lindhe, Karring e Lang (2005). A sonda periodontal foi utilizada como instrumento sensor na determinação de sangramento gengival como resposta, na detecção de cálculo subgengival e profundidade da bolsa periodontal. A força empregada não foi superior a 20 gramas.

O nível clínico de inserção teve como referência a junção amelocementária (JAC), que fica exposta ou visível quando ocorre recessão gengival.

Foi utilizada a classificação de Lopez et al. (2002) para o diagnóstico de doença periodontal nas mulheres avaliadas. As mulheres que apresentaram quatro ou mais dentes, com um ou mais sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 4 mm, e perda de inserção periodontal maior ou igual a 3 mm no mesmo sítio, foram diagnosticadas como portadoras de doença periodontal.

5.5.3.3 Coleta da comunidade microbiana

A coleta das amostras para avaliação da comunidade microbiana foi realizada antes do exame clínico periodontal, compreendendo a coleta de saliva e coleta de biofilme subgengival da seguinte forma e sequência:

- Coleta de saliva

Amostras de saliva não estimulada foram coletadas de cada paciente em recipientes de plásticos esterilizados. Foram transferidos, com auxílio de pipeta automática, 900 µl de saliva para um tubo de microcentrífuga contendo 100 µl de solução de paraformaldeído a 20%. As amostras foram mantidas refrigeradas e transportadas imediatamente para o Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Micro-organismos da UFJF. As amostras fixadas foram armazenadas a -20°C para análise microbiológica.

- Coleta de biofilme subgengival

A coleta de biofilme subgengival obedeceu ao protocolo estabelecido por Madianos et al. (2001), com ligeira modificação. Os sítios a serem coletados foram isolados com roletes de algodão e o biofilme supragengival foi removido com uma gaze estéril. Foi realizada coleta de biofilme subgengival da superfície mesial de dois primeiros molares opostos e contralaterais (ou, se ausente, do dente posterior mais próximo), utilizando uma cureta de Gracey estéril (Hu-Friedy[®], Chicago, IL, USA). As duas amostras foram então transferidas para um tubo de microcentrífuga e foram mantidas refrigeradas em gelo seco e transportadas para manipulação laboratorial.

Os microtubos foram pesados antes e imediatamente após a coleta com o objetivo de padronizar a coleta e facilitar a análise quantitativa. As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2%. O material fixado foi mantido refrigerado a -20°C até serem utilizados para a análise microbiológica.

5.5.4 Tratamento laboratorial da amostra e realização da técnica de FISH

A qualificação e quantificação dos periodontopatógenos foram determinadas pela técnica de FISH (CESAR, 2002; COTTREL; KIRCHMAN, 2000), realizada no Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Micro-organismos da UFJF.

Após fixadas em paraformaldeído com concentração final a 2%, as amostras foram preparadas de acordo com o protocolo de Epstein e Rossel (1995). As amostras foram pré-incubadas com Tweed 80 a 0,0001% por 15 minutos. Após a incubação, foi realizada sonicação por uma sonda sônica (VCX-130PB, Sonics e Materials Inc., Newton, CT, EUA) equipada com uma micropona cônica de 5 mm, durante 30 segundos, por três vezes. Posteriormente, as amostras foram agitadas e deixadas para sedimentar por 5 segundos e, então, coletou-se o sobrenadante. Foi utilizada água Milli-Q para lavar a amostra por três vezes. Todas as três frações de sobrenadante foram coletadas e centrifugadas (500 x g, 5 min). Finalmente, 3 mL da amostra foram filtrados em um filtro de membrana de 0,2 µm.

Foram utilizadas oito sondas espécie-específicas de oligonucleotídeos 16RNAr (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA), marcadas com o marcador fluorescente Cy3 (Quadro 1).

Quadro 1 – Periodontopatógenos e sequência das sondas de oligonucleotídeos de RNAr.

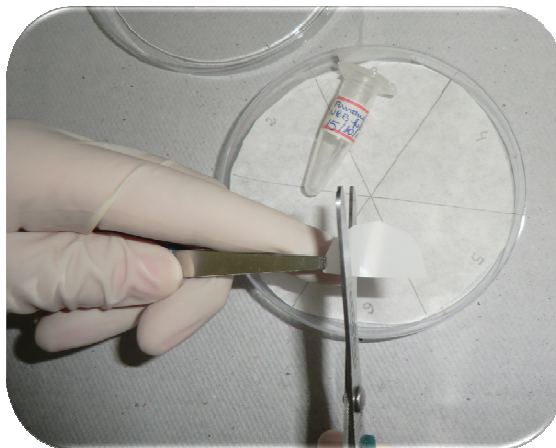
| Sonda | Espécies | Sequencia (5'- 3') | Formamida (%) | NaCl (mM) | Referência |
|---------|---------------------------------|---------------------------|---------------|-----------|------------------------|
| ACAC | <i>A. actinomycetemcomitans</i> | TCCATAAGACAGATTC' | 30 | 112 | Sunde et al., 2003 |
| B/TAFO | <i>T. forsythia</i> | CGTATCTCATTTTATCCCCTGTA | 30 | 112 | Sunde et al., 2003 |
| CARE | <i>C. rectus</i> | TTAACTTATGTAAAGAAG | 20 | 225 | Riep et al., 2009 |
| POGI | <i>P. gingivalis</i> | CAATACTCGTATCGCCCGTTATTC | 30 | 112 | Sunde et al., 2003 |
| TRE II | <i>T. denticola</i> | GCTCCTTTCCTCATTTACCTTTAT' | 30 | 112 | Moter et al., 1998 |
| FUS664 | <i>F. nucleatum</i> | CTTGTAGTTCCG C(C/T)TACCTC | 40 | 56 | Gmür et al., 2004 |
| Pint649 | <i>P. intermedia</i> | GCCGCCRCCTGAASTCAAGCC | 40 | 56 | Gmür e Thurnheer, 2002 |
| Pnig657 | <i>P. nigrescens</i> | TCCGCCTGCGCTGCGTGTA | 40 | 56 | Gmür e Thurnheer, 2002 |

Fonte: O autor.

Um marcador controle negativo (NON-5'-3CCTAGTGACGCCGTGCGAC-3'), que não possui especificidade para nenhum grupo bacteriano, foi utilizado para a avaliação da eficiência da hibridização (COTTRELL; KIRCHMAN, 2000).

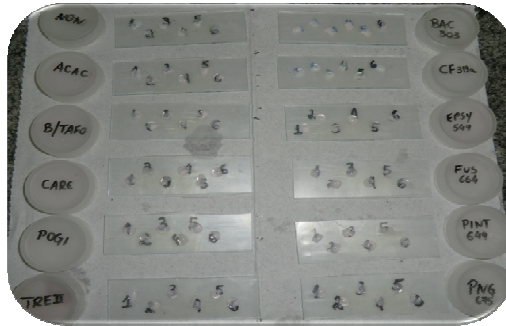
Os filtros foram, então, divididos em nove partes iguais, uma para cada sonda espécie-específica e a nona parte para a sonda negativa (Fotografia 1) Cada pedaço de filtro foi colocado em uma lâmina de vidro revestida com parafilme e foi coberto com 30 μ L da solução de hibridização em uma concentração final de 2,5 ng/ μ L da sonda de oligonucleotídeo (Fotografia 2). A solução de hibridização foi composta por NaCl 0,9 M, Tris-HCL 20 mM (pH 7.4), dodecil sulfato de sódio 0.01% e a concentração de formamida específica para cada peridotopatógeno (Tabela 1). A amostra foi incubada em uma estufa a 42°C por uma noite (Fotografia 3). Após a hibridização, a amostra foi transferida para uma solução de lavagem, contendo Tris-HCl 20 mM (pH 7.4), EDTA 5 mM, dodecyl sulfato de sódio 0.01% e uma concentração de NaCl apropriada para a sonda específica, e então a amostra foi incubada 48°C por 15 minutos (Fotografia 4). As células bacterianas foram coradas com 2 μ g de DAPI (4',6'- diamidino-2-phenylindole) por mL para que pudesse ser realizada a contagem bacteriana total (Fotografia 5). Cada pedaço do filtro foi imerso em etanol 80% (v/v) por três vezes e deixado para secar. Finalmente, a lâmina foi montada utilizando glicerol e Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) na proporção de 4:1 (Fotografia 6).

Fotografia 1: Divisão dos filtros de policarbonato em nove partes para a aplicação da solução de hibridização com cada sonda específica.



Fonte: o autor.

Fotografia 2: Amostras submetidas às sondas diluídas em solução de hibridização com porcentagem específica em uma concentração final de 2,5 ng/μL.



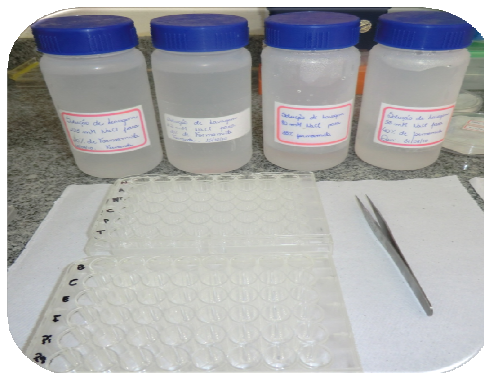
Fonte: o autor.

Fotografia 3: Amostras em câmeras de hibridização para cada sonda específica, colocadas em estufa a 42°C por uma noite.



Fonte: o autor.

Fotografia 4: Colocação dos filtros, após a hibridização, em 1 ml de solução tampão para lavagem e aquecimento em estufa a 48°C por 15 minutos.



Fonte: o autor.

Fotografia 5: Amostras coradas com DAPI por 3 minutos para a contagem das células bacterianas totais.



Fonte: o autor.

Fotografia 6: Lâmina montada por amostra para posterior visualização em microscópio.



Fonte: o autor.

As células bacterianas totais e de cada espécie foram contadas utilizando um microscópio Olympus BX60 equipado com os filtros DAPI 31000 e Cy3 41007a (Chroma, Bellows Falls, VT, USA), respectivamente. A contagem foi realizada em dez campos aleatórios por um único pesquisador treinado. O número final de bactérias foi calculado pela multiplicação das diluições realizadas durante o tratamento da amostra. O percentual de cada espécie em relação à contagem das células bacterianas totais foi calculado. Os resultados foram expressos em céls/g (para biofilme subgengival) e em céls/mL (para saliva).

Para documentação, foram realizadas fotomicrografias com uma câmera Evolution VF Color Cooled (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, USA), acoplada ao microscópio.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados em um banco de dados no programa estatístico *Statistical Package for Social Science (SPSS)* versão 14.0 para *Windows* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5.6.1 Análise descritiva

Os dados foram descritos por meio de frequência absoluta e relativa para variáveis categóricas e valores de média, desvio padrão, valores mínimo e máximo para variáveis numéricas.

5.6.2 Análise inferencial

O teste *U* de *Mann-Whitney* foi utilizado para comparação da condição periodontal clínica e microbiológica entre os grupos (gestantes e não gestantes).

Para a comparação longitudinal, foi empregado o teste de *Friedman* para a comparação nos três momentos de avaliação, seguido do teste de *Wilcoxon* para comparação entre dois momentos.

Em todas as análises, o nível de significância adotado foi de 5% ($P < 0,05$).

5.7 ESTUDO PILOTO

O estudo piloto foi realizado com a finalidade de treinar a pesquisadora em relação à realização de entrevista, exame físico, bem como padronizar a coleta da

comunidade microbiana, a técnica de tratamento laboratorial da amostra e a realização da técnica de FISH.

Este estudo compreendeu três fases, da seguinte forma:

- Primeira fase: aperfeiçoamento do instrumento da coleta de dados, teste do prontuário estruturado, treinamento do pesquisador por profissional com experiência nas áreas de Periodontia e Cirurgia e treinamento e padronização da coleta da comunidade bacteriana.
- Segunda fase: teste da confiabilidade dos resultados obtidos após o treinamento e a calibração intraexaminador, por meio da repetição do exame da condição periodontal, em intervalo de sete dias, em 10% da amostra total (50 mulheres). Ao término dos exames, os dados coletados foram digitados no programa EPI INFO 6.04 e comparados por meio do teste de concordância Kappa (BRASIL, 2001).
- Terceira fase: treinamento e definição da metodologia de FISH para diagnóstico dos parodontopatógenos das amostras de saliva, biofilme subgengival e fluido de sulco gengival no Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Micro-organismos da UFJF.

5.7.1 Teste de pesagem da amostra

Este procedimento teve por objetivo padronizar a coleta e possibilitar as análises quantitativas da amostra. Foram realizados dois testes de pesagem antes e depois da coleta de amostras de saliva, biofilme subgengival e fluido de sulco gengival de sete gestantes, utilizando balança de precisão de 5 casas (AB204-S, Mettler-Toledo Ind. e Com. Ltda., Barueri, SP, Brasil), da seguinte maneira:

- Grupo 1 – Pesagem dos tubos de microcentrífuga com paraformaldeído para coleta de biofilme subgengival: Os tubos, já rotulados, foram pesados antes e após a coleta da amostra.
- Grupo 2 – Pesagem dos tubos de microcentrífuga sem paraformaldeído para coleta de biofilme subgengival: Os tubos rotulados, porém sem paraformaldeído, foram pesados antes e após a coleta, sendo adicionado o

paraformaldeído somente após a segunda pesagem. Neste caso, o cone de papel foi pesado dentro do tubo de microcentrífuga na primeira pesagem.

Não foi necessária a realização de teste de pesagem para a coleta de saliva, pois foi estipulado um volume fixo da mesma por amostra.

5.7.2 Teste de centrifugação e centrifugação/sonicação da amostra

Este teste foi realizado com o objetivo de verificar a diferença no tratamento das amostras por centrifugação e centrifugação/sonicação.

Foram utilizadas amostras de saliva e biofilme subgengival coletadas de três gestantes. As seis amostras de saliva (n=3) e biofilme (n=3) fixadas em paraformaldeído foram centrifugadas (Centrifuge 5424, Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) a 10.000 rpm, durante 5 minutos. Em seguida, por duas vezes, foi retirado o sobrenadante, adicionado 1,5 ml de PBS (solução tampão de fosfato) e realizada outra centrifugação (PERNTHALER et al., 2001). Após a última centrifugação, retirou-se o sobrenadante e foi adicionado no tubo 1,5 ml de mistura de 1:1 de PBS/etanol (95%).

As amostras centrifugadas contendo PBS/etanol foram divididas em duas alíquotas. Apenas uma alíquota de cada amostra foi sonicada, utilizando o aparelho de ultrassom VCX 130 PB (Sonics & Materials Inc, Newtown, CT, USA), na amplitude de 110 μ m, três vezes, por 60 segundos com intervalo de 30 segundos.

Assim, cada amostra foi separada em dois tratamentos:

- Tratamento 1: amostras centrifugadas.
- Tratamento 2: amostras centrifugadas e sonicadas.

Para contagem direta, 500 μ l de cada amostra de ambos os grupos, foram filtrados em um filtro de membrana de 0,2 μ m. Uma parte de cada filtro foi corada com DAPI (4,6-diamidina-2-fenilindol) e observada no microscópio de epifluorescência Olympus BX 60 (Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), no aumento 1000 vezes, com o filtro de luz ultravioleta. A parte restante dos filtros foi armazenada em geladeira.

Após organização dos resultados em um banco de dados no programa estatístico *SPSS* versão 14.0 para *Windows*, foi obtida a média da contagem de

bactérias por cada amostra em cada grupo e foi aplicado o teste-t pareado para a comparação entre os tratamentos. O nível de significância adotado foi de 5% ($P \leq 0,05$).

Os resultados dos testes realizados estão apresentados no Apêndice C.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados na forma de um artigo científico intitulado “*Detection and enumeration of periodontopathogenic bacteria in subgingival biofilm of pregnant women*”, aceito para publicação no periódico Brazilian Oral Research, em 16/06/2012 (Anexo C), e publicado no volume 26, número 5, páginas 443-9, Sep-Oct, 2012.

Os outros resultados e discussão serão apresentados conforme os seguintes tópicos:

- Alterações clínicas e microbiológicas no biofilme subgengival de mulheres na gestação e no pós-parto.
- Alterações microbiológicas na saliva de e mulheres na gestação e no pós-parto e de um grupo de não gestantes.

Além disso, o presente estudo originou resumos de trabalhos apresentados em congressos na modalidade pôster (Apêndices D e E).

6.1 ARTIGO CIENTÍFICO INTITULADO “*DETECTION AND ENUMERATION OF PERIODONTOPATHOGENIC BACTERIA IN SUBGINGIVAL BIOFILM OF PREGNANT WOMEN*”

Original Article

Microbiology

Detection and enumeration of periodontopathogenic bacteria in subgingival biofilm of pregnant women

Fernanda Campos Machado^(a)

Dionéia Evangelista Cesar^(b)

Amanda Vervloet Dutra Agostinho Assis^(c)

Cláudio Galuppo Diniz^(d)

Rosangela Almeida Ribeiro^(c)

^(a) Postgraduate Program in Health, School of Medicine, Univ Federal de Juiz de Fora – UFJF, Juiz de Fora, MG, Brazil.

^(b) Department of Ecology and Molecular Biology of Microorganisms, Biological Sciences Institute, Univ Federal de Juiz de Fora – UFJF, Juiz de Fora, MG, Brazil.

^(c) Department of Social and Child Dentistry, School of Dentistry, Univ Federal de Juiz de Fora – UFJF, Juiz de Fora, MG, Brazil.

^(d) Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Biological Sciences Institute, Univ Federal de Juiz de Fora – UFJF, Juiz de Fora, MG, Brazil.

Manuscript information

Submitted: Mar 15, 2012

Accepted for publication: Jun 05, 2012

Last revision: Jun 17, 2012

Corresponding author: Fernanda Campos Machado

Email: fercampo@terra.com.br

ABSTRACT

The aim of this study was to use the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique to test the hypothesis of qualitative and quantitative differences of 8 periodontopathogens between pregnant and non-pregnant women. This cross-sectional study included 20 pregnant women in their second trimester of pregnancy and 20 non-pregnant women. Probing depth, bleeding on probing, clinical attachment level, and presence of calculus were recorded. Subgingival plaque samples were collected and the FISH technique identified the presence and numbers of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. The Mann-Whitney *U*-test was applied to compare the data between the two groups. The mean age, ethnicity, marital status, education, and economic level in both groups were similar. The clinical parameters showed no significant differences between pregnant and non-pregnant women. The numbers of subgingival periodontopathogens were not found to be significantly different between groups, despite the higher mean counts of *P. intermedia* in pregnant women. Colonization patterns of the different bacteria most commonly associated with periodontal disease were not different in the subgingival plaque of pregnant and non-pregnant women.

Descriptors: Pregnancy; Microbiology; Biofilms; *In Situ* Hybridization, Fluorescence.

Introduction

The hormonal changes in pregnant women appear to be correlated with the enhanced growth of certain Gram-negative anaerobic bacteria in the oral cavity, stimulating the growth of *Prevotella intermedia* in particular.¹⁻³ Higher levels of *Campylobacter rectus* and *Prevotella nigrescens* have also been found among these women.^{4,5} However, this issue remains controversial.

In addition, during pregnancy, other periodontal pathogens, such as *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Treponema denticola*, should also be taken into account because of the relationship between certain subgingival species and preterm birth.⁶⁻⁸ Further studies are needed to identify the etiologic factors that might explain this relationship.⁹

In previous studies with pregnant women, periodontopathogens have been identified by traditional anaerobic culture methods, PCR-based methods, or DNA-DNA hybridization.^{1-5,10,11} About 50% of oral bacterial strains cannot be cultured by conventional methods. For some periodontopathogens, molecular techniques, such as PCR, real-time PCR, or DNA-DNA hybridization, have been used successfully to detect microorganisms that are difficult to culture.^{4,5,9} Nonetheless, these methods are only qualitative or semi-quantitative, or are used to quantify the numbers of amplified copies of genes and/or gene expression, and thereby do not provide information about the morphology, specific numbers, and spatial distribution of microorganisms. In this context, one technique that could be used is fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with synthetic ribosomal RNA (rRNA)-target oligonucleotide probes. In this technique, the cell remains intact and each individual cell can be counted.^{12,13}

The FISH technique could provide accurate information on periodontal microbiota in normal pregnancy, to improve our knowledge of the relationship between pregnancy and periodontal disease and to help identify the microbiota that might be linked to risks for birth complications.

We conducted the present study using the FISH technique to test the hypothesis of qualitative and quantitative differences of *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *P. intermedia* and *P. nigrescens* between pregnant and non-pregnant women.

Methodology

We adopted a cross-sectional research design and identified a convenience sample. The study was approved by the Ethics Committee in Human Research of the Federal University of Juiz de Fora (UFJF), MG, Brazil (protocol number 130/2010). All participants signed an informed consent form. The present data represent cases enrolled between June and December 2010. Expectant mothers were recruited during routine prenatal health visits, and the non-pregnant women were recruited from the Reception Department of the School of Dentistry of UFJF.

Information about age, marital status, education and economic levels, and medical history was assessed by interview.

Study population

The pregnant group in the study population (Pr group) was comprised of 20 consecutive women from 24 to 32 years old at gestational stage between 14 and 24 weeks. Gestational age was confirmed by ultrasound. Twenty non-pregnant women within the same age range were recruited as controls (N-Pr group).

All participants were in good general health and had a minimum of 20 permanent teeth. Women with chronic disease, smokers, alcohol dependency, reported use of systemic antibiotics and/or psychotropic or anticonvulsant medication in the preceding 3 months, as well as those who required prophylactic antibiotics for periodontal examination or who had received professional tooth-cleaning in the preceding 6 months, or who were orthodontic patients, were excluded.

Periodontal examination

Full-mouth data were recorded according to the following clinical parameters:

- probing depth (PD),
- bleeding on probing (BOP)¹⁴,
- clinical attachment level (CAL) and
- presence of calculus (PC).

All teeth were examined, with the exception of third molars, by means of a North Carolina periodontal probe (PCP-UNC 15, Hu-Friedy Manufacturing Inc., Chicago, USA). Six sites *per* tooth were examined, and the highest scores of PD, CAL, BOP, and PC were registered for each tooth. Periodontal examination was conducted by a single trained and calibrated dentist (FCM). Intra-examiner agreement showed Cohen's Kappa coefficients of 0.86 for PD and 0.90 for CAL.

Periodontal disease was defined as the presence of 4 or more teeth with 1 or more sites of $PD \geq 4$ mm and $CAL \geq 3$ mm at the same site.¹⁵

Microbiological analysis

The plaque sampling followed the protocol established by Madianos *et al.*⁸ Supragingival biofilm was removed with sterile gauze, and subgingival biofilm samples were collected from the mesial surfaces of 2 opposite and contralateral first molars (or, if missing, the next most posterior tooth) by means of sterile Gracey curettes (Hu-Friedy Manufacturing Inc.). The biofilm samples were transferred into a

1.5-mL screw-cap microtube and immediately transported on dry ice to the laboratory.

The microtubes were weighed before and immediately after the sampling, to standardize the collection and facilitate the quantitative analysis. Samples were fixed and stored in paraformaldehyde solution, 2% final concentration. The material was kept in a freezer at -20°C until it was used for microbiological analysis.

The FISH technique was carried out to identify and enumerate the periodontal pathogens in the subgingival biofilm of the women. Eight species-specific 16S rRNA oligonucleotide probes (Operon Technologies Inc., Alameda, USA), labeled with Cy3 fluorescent dye, were used (Table 1).¹⁶⁻²⁰

Table 1. Sequences of 16S rRNA oligonucleotide probes and formamide concentrations for fluorescence *in situ* hybridization.

| Probe | Target species | Sequence (5'- 3') | Formamide (%) | Reference |
|---------|---------------------------------|---------------------------|---------------|-----------------------------------|
| ACAC | <i>A. actinomycetemcomitans</i> | TCCATAAGACAGATTC' | 30 | Sunde <i>et al.</i> ¹⁶ |
| B/TAFO | <i>T. forsythia</i> | CGTATCTCATTTCATCCCTGTA | 30 | Sunde <i>et al.</i> ¹⁶ |
| CARE | <i>C. rectus</i> | TTAACTTATGTAAAGAAG | 20 | Riep <i>et al.</i> ¹⁷ |
| POGI | <i>P. gingivalis</i> | CAATACTCGTATCGCCCGTTATTC | 30 | Sunde <i>et al.</i> ¹⁶ |
| TRE II | <i>T. denticola</i> | GCTCCTTTCCTCATTTACCTTTAT' | 30 | Moter <i>et al.</i> ¹⁸ |
| FUS664 | <i>F. nucleatum</i> | CTTGTAGTTCCG C(C/T)TACCTC | 40 | Gmür <i>et al.</i> ¹⁹ |
| Pint649 | <i>P. intermedia</i> | GCCGCCRCTGAASTCAAGCC | 40 | Gmür and Thurnheer ²⁰ |
| Pnig657 | <i>P. nigrescens</i> | TCCGCCTGCGCTGCGTGTA | 40 | Gmür and Thurnheer ²⁰ |

A negative control probe (5'-CCTAGTGACGCCGTCGAC-3'), with a sequence that should not bind to any prokaryote rRNA, was used.²¹

The samples were prepared by sonication and centrifugation,²² after which a 5-mL sample was filtrated into 0.2 µm membrane filters.

FISH was performed according to a method described by Cottrel and Kirchman.²¹ The filters were divided into 9 equal pieces. Each piece was placed on a slide, overlaid with a hybridization solution at a final concentration of 2.5 ng/µL of

Cy3-labeled oligonucleotide probe, and incubated in a sealed container overnight at 42°C. The hybridization solution contained 0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.01% sodium dodecyl sulfate, and the concentration of formamide determined to achieve specificity for each targeted group of bacteria (Table 1). After hybridization, the sample was transferred to a washing solution and stained with 2 µg of DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) *per* mL, so that the bacterial cells could be counted.

Total bacterial cells and cells from each species were counted by means of an Olympus BX60 microscope fitted with a DAPI filter 31000 and Cy3 filter 41007a (Chroma, Bellows Falls, USA), respectively. The numbers of cells observed in 10 randomized microscopic ocular grid fields *per* sample were counted by a single trained observer (FCM). The final number of bacteria was calculated from the multiplication of the dilutions performed throughout the treatment of the sample, based on the initial weight. Results are presented in cells/g.

For documentation, photomicrographs were taken with an Evolution VF Color Cooled camera (Media Cybernetics Inc., Bethesda, USA) attached to the microscope.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed with SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Nominal data were described by relative and/or absolute frequencies. Numerical data were described by mean, standard deviation, and minimum and maximum values. The non-parametric Mann-Whitney *U*-test was used for data comparison between the Pr and N-Pr groups. Data were considered as statistically significant at *p*-values < 0.05.

Results

The mean age of the pregnant women was 26.4 years (SD ±2.5), while that of the non-pregnant women was 27.4 years (SD ±2.2). In the Pr group, the mean gestational age was 18.9 weeks (SD ±3.4).

No significant differences were observed between the Pr and N-Pr groups in terms of age (*p* = 0.584), ethnicity (*p* = 0.393), marital status (*p* = 0.251), education (*p* = 0.478), and economic level (*p* = 0.315).

Periodontal status

Both groups had similar periodontal conditions. There were no significant differences between Pr and N-Pr groups in numbers of teeth and their clinical parameters (Table 2). Among the Pr and N-Pr groups, 14 and 16 women, respectively, had no periodontal disease ($p = 0.256$).

Table 2. Clinical periodontal parameters of pregnant and non-pregnant women

| Variable | Pr group (n = 20) | N-Pr group (n = 20) | p value |
|-----------------------------|-------------------|---------------------|---------|
| | Mean ± SD | Mean ± SD | |
| Mean number of teeth | 26.7 ± 1.3 | 26.1 ± 2.2 | 0.53 |
| Teeth with BOP (%) | 48.1 ± 30.9 | 49.3 ± 29.2 | 0.79 |
| Teeth with PC (%) | 12.3 ± 11.9 | 13.4 ± 20.2 | 0.61 |
| Teeth with PD = 4-5 mm (%) | 6.3 ± 15.4 | 1.7 ± 4.1 | 0.55 |
| Teeth with PD ≥ 6 mm (%) | 0.9 ± 3.3 | 0.2 ± 0.9 | 0.53 |
| Teeth with CAL = 3-5 mm (%) | 1.2 ± 3.3 | 0 | 0.15 |

*BOP = bleeding on probing; PC = presence of calculus; PD = probing depth; CAL = clinical attachment level; SD = standard deviation; n = number.

Microbiological results

The mean total bacterial count was $492 \times 10^7 \pm 233 \times 10^7$ cells/g and $624 \times 10^7 \pm 301 \times 10^7$ cells/g for the Pr and N-Pr groups, respectively. Statistical analysis demonstrated no significant difference between groups ($p = 0.13$).

Analysis by the Mann-Whitney *U*-test failed to demonstrate significant differences between groups in the numbers of all bacterial species evaluated (Table 3).

Table 3. Mean, standard deviation (SD), and minimum and maximum values of the counts of periodontal pathogens from pregnant (Pr group) and non-pregnant (N-Pr group) women.

| Periodontal pathogen (cells x 10 ⁷ /g) | Pr group (n = 20) | | | N-Pr group (n = 20) | | | p value |
|--|-------------------|---------|---------|---------------------|---------|---------|---------|
| | Mean ± SD | Minimum | Maximum | Mean ± SD | Minimum | Maximum | |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | 12 ± 13 | 0.8 | 56 | 19 ± 25 | 0 | 89 | 0.95 |
| <i>T. forsythia</i> | 26 ± 22 | 2.5 | 75 | 28 ± 23 | 7.0 | 85 | 0.63 |
| <i>C. rectus</i> | 16 ± 16 | 0 | 54 | 31 ± 47 | 0 | 143 | 0.79 |
| <i>P. gingivalis</i> | 25 ± 41 | 0 | 181 | 22 ± 21 | 0 | 81 | 0.75 |
| <i>T. denticola</i> | 18 ± 16 | 0 | 59 | 19 ± 22 | 0 | 88 | 0.79 |
| <i>F. nucleatum</i> | 26 ± 30 | 0 | 133 | 40 ± 30 | 0 | 102 | 0.07 |
| <i>P. intermedia</i> | 54 ± 107 | 0 | 474 | 35 ± 30 | 2.0 | 98 | 0.34 |
| <i>P. nigrescens</i> | 30 ± 28 | 0 | 116 | 34 ± 32 | 0 | 131 | 0.74 |

Figure 1 shows a field from a representative plaque sample stained for total bacterial cells (with DAPI) and for *P. intermedia* (with probe Pint649). The images

demonstrate the presence of these bacterial cells in pregnant and non-pregnant women.

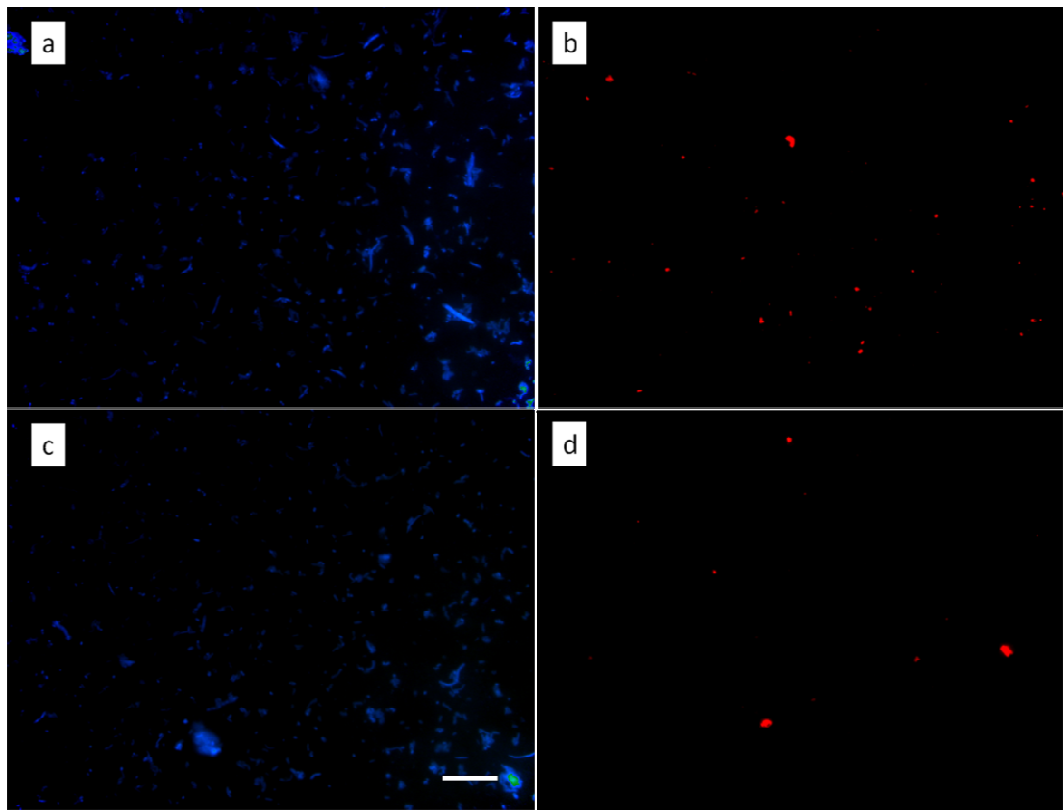


Figure 1. DAPI staining for total bacterial cell counts and *P. intermedia* of subgingival plaque samples from pregnant (a, b) and non-pregnant (c, d) women. The scale bar indicates 20 μ m.

Discussion

To our knowledge, this is the first study that has used the FISH technique to assess periodontopathogens during pregnancy.

All women included in the present study were from 24 to 32 years old, and most had no periodontal disease. Both groups were similar in terms of clinical periodontal parameters and were matched by age, ethnicity, marital status, education, and economic level. In older people, periodontal disease is likely to be more pronounced.²³ Also, different specific stages in life, such as puberty and menopause, can modulate periodontal tissue response and therefore contribute to periodontal disease.²⁴ Additionally, oral health status could also be related to the level of education, ethnicity, marital status, and economic level.²³ The young mean age of this study population, together with the similarities in the socio-demographic

variables and clinical periodontal parameters, might have resulted in the absence of differences in terms of the composition of the subgingival microbiota.

Although exacerbated gingival inflammation in pregnant women has been clinically and histologically well-documented, its aetiology has not yet been clearly established, and it is not known why only some pregnant women develop frank signs of gingival inflammation.^{11,25} Changes in the sub- or supragingival biofilm¹⁻³ have been proposed as a potential mechanism; however, there are only limited data on the composition of the subgingival microbiota during pregnancy.

An increase in *P. intermedia* in the subgingival biofilm of pregnant women during the second trimester was first reported in 1980.¹⁻³ In our study, elevated counts of *P. intermedia* were observed in the Pr-group; however, no significant differences were seen. Other investigators also showed no significant microbiological differences between pregnant and non-pregnant women.^{5,10}

Differences in methods used to assess bacteria may partly explain the results reported. In most cases, the previously mentioned studies^{1-3,10,11} used classic microbiological analyses, such as culture methods, which are hampered by the complexity of the periodontal microbiota and the fastidious nature of these microorganisms.^{11,13} These methods can also be laborious, time-consuming and prone to statistical and methodological errors.¹³ More recently, techniques that do not require previous culturing, like PCR-based assays and DNA-DNA hybridization, have been used to detect periodontal pathogens in pregnant women,^{4,5,9} but so far they have the disadvantage of yielding only qualitative or semi-quantitative data.^{13,20} FISH combines the precision of molecular genetics with the visual information from microscopy, allowing direct visualization and identification of individual cells within their natural microhabitat or diseased tissue.¹³ Additionally, this technique showed a high standard deviation and a high variability of bacterial loads in this population by the count of absolute values, not only by the presence or absence of microorganisms, as with other molecular techniques.

Increasing evidence is accumulating that oral bacteria may translocate directly into the pregnant uterus, causing localized inflammation and adverse pregnancy outcomes, notwithstanding the presence of clinical periodontitis.²⁶ *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *C. rectus*, and *T. forsythia* are examples of such species.⁶⁻⁸ The high levels of these pathogens observed in pregnant women in the present study, independent of the presence of periodontitis or

the lack of differences in comparison with non-pregnant women, may be suggested as an increased risk of adverse pregnancy outcomes. Early diagnosis and extra care in control of these microorganisms might be necessary.

One can imagine that levels of periodontal bacteria would vary according to gestational phase. Nevertheless, previous studies have shown that the highest proportions of periodontal pathogens and the major changes in clinical parameters occur in the second trimester of pregnancy,^{2,5,9} which was an inclusion criterion for this study. Continued longitudinal studies with the FISH technique would enable investigators to verify the actual subgingival microbiological patterns during pregnancy and *post partum*. In addition, the periodontal pathogens in other samples, *e.g.*, saliva or gingival crevicular fluid, should be investigated by FISH.

Furthermore, we do not ignore the fact that periodontal microbiological patterns could be associated with plaque index, which was not recorded in our study. Despite that limitation, the results of this study of pregnant and non-pregnant women provide additional insights into their periodontal microbiota, identified and quantified by the FISH technique.

The fact that the subgingival microbiota in healthy pregnant women did not differ from that in the non-pregnant women may suggest that the hormonal changes in pregnancy exert little, if any, influence on colonization/growth patterns of the 8 different bacteria most commonly associated with periodontal disease, at least in women with little evidence of periodontitis.

Conclusions

The study did not confirm the hypothesis of qualitative and quantitative differences, between pregnant and non-pregnant women, in terms of the 8 periodontopathogens evaluated by the FISH technique.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Luiz Cláudio Ribeiro (Department of Statistics, UFJF, Brazil) for assistance with the statistical analysis. This study was supported by research grants from CAPES, Brasilia, Brazil, as well as by grants from the Postgraduate Program in Health of UFJF, Brazil.

References

1. Jensen J, Liljemark W, Bloomquist C. The effect of female sex hormones on subgingival plaque. *J Periodontol.* 1981 Oct;52(10):599-602.
2. Kornman KS, Loesche WJ. The subgingival microbial flora during pregnancy. *J Periodontal Res.* 1980 Mar;15(2):111-22.
3. Muramatsu Y, Takaesu Y. Oral health status related to subgingival bacterial flora and sex hormones in saliva during pregnancy. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1994 Aug;35(3):139-51.
4. Yokoyama M, Hinode D, Yoshioka M, Fukui M, Tanabe S, Grenier D, et al. Relationship between *Campylobacter rectus* and periodontal status during pregnancy. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Feb;23(1):55-9.
5. Gürsoy M, Haraldsson G, Hyvönen M, Sorsa T, Pajukanta R, Könönen E. Does the frequency of *Prevotella intermedia* increase during pregnancy? *Oral Microbiol Immunol.* 2009 Aug;24(4):299-303.
6. Hasegawa K, Furuichi Y, Shimotsu A, Nakamura M, Yoshinaga M, Kamitomo M, et al. Associations between systemic status, periodontal status, serum cytokine levels, and delivery outcomes in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *J Periodontol.* 2003 Dec;74(12):1764-70.
7. Offenbacher S, Jared HL, O'Reilly PG, Wells SR, Salvi GE, Lawrence HP, et al. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol.* 1998 Jul;3(1):233-50.
8. Madianos PN, Lieff S, Murtha AP, Boggess KA, Auten RL, Beck JD, et al. Maternal periodontitis and prematurity. Part II: Maternal infection and fetal exposure. *Ann Periodontol.* 2001 Dec;6(1):175-82.
9. Adriaens LM, Alessandri R, Sporri S, Lang NP, Persson GR. Does pregnancy have an impact on the subgingival microbiota? *J Periodontol.* 2009 Jan;80(1):72-81.
10. Jonsson R, Howland BE, Bowden GH. Relationships between periodontal health, salivary steroids, and *Bacteroides intermedius* in males, pregnant and non-pregnant women. *J Dent Res.* 1988 Aug;67(8):1062-9.
11. Carrillo-de-Albornoz A, Figuero E, Herrera D, Bascones-Martinez A. Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol.* 2010 Mar;37(3):230-40.
12. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 1995 Mar;59(1):143-69.
13. Moter A, Gobel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods.* 2000 Jul;41(2):85-112.
14. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975 Dec;25(4):229-35.
15. López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. *J Dent Res.* 2002 Jan;81(1):58-63.
16. Sunde PT, Olsen I, Gobel UB, Theegarten D, Winter S, Debelian GJ, et al. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. *Microbiology.* 2003 May;149(Pt 5):1095-102.
17. Riep B, Edesi-Neuss L, Claessen F, Skarabis H, Ehmke B, Flemmig TF, et al. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *J Clin Microbiol.* 2009 Jun;47(6):1705-11.

18. Moter A, Hoenig C, Choi BK, Riep B, Göbel UB. Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. *J Clin Microbiol.* 1998 May;36(5):1399-403.
19. Gmür R, Wyss C, Xue Y, Thurnheer T, Guggenheim B. Gingival crevice microbiota from Chinese patients with gingivitis or necrotizing ulcerative gingivitis. *Eur J Oral Sci.* 2004 Feb;112(1):33-41.
20. Gmür R, Thurnheer T. Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical specimens. *Microbiology.* 2002 May;148(Pt 5):1379-87.
21. Cottrell MT, Kirchman DL. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Dec;66(12):5116-22.
22. Epstein SS, Rossel J. Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. *Mar Ecol Prog Ser.* 1995;117:289-98.
23. Taani DQ, Habashneh R, Hammad MM, Batieha A. The periodontal status of pregnant women and its relationship with socio-demographic and clinical variables. *J Oral Rehabil.* 2003 Apr;30(4):440-5.
24. Markou E, Eleana B, Lazaros T, Antonios K. The influence of sex steroid hormones on gingiva of women. *Open Dent J.* 2009 Jun;3:114-9.
25. Mealey BL, Moritz AJ. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontol* 2000. 2003 Jun;32(1):59-81.
26. Han YW. Oral health and adverse pregnancy outcomes - what's next? *J Dent Res.* 2011 Mar;90(3):289-93.

6.2 ALTERAÇÕES CLÍNICAS E MICROBIOLÓGICAS NO BIOFILME SUBGENGIVAL DE MULHERES NA GESTAÇÃO E NO PÓS-PARTO

Resultados

A média de idade das mulheres avaliadas foi de $26,7 \pm 2,5$ anos e a média da idade gestacional no primeiro exame foi de $19,0 \pm 3,3$ semanas.

Das 31 mulheres avaliadas no segundo trimestre, 24 foram reavaliadas 48 horas após o parto e 18, oito semanas após o parto. Os motivos da perda de algumas participantes nos exames de acompanhamento foram desistência por motivos pessoais (perda de interesse ou falta de tempo), mudança de cidade e impossibilidade de localização das mulheres pelos pesquisadores. Todas as crianças nasceram a termo (média $39,0 \pm 1,47$ semanas, amplitude 37-41 semanas) e com peso normal (média de $3,283 \pm 0,467$ kg, amplitude 2,525-4,220 kg).

Parâmetros clínicos

Os dados da condição clínica nos três momentos de avaliação estão apresentados na Tabela 1. Em todos os momentos, a média de dentes avaliados foi de $27,0 \pm 1,3$ dentes (amplitude 24-28 dentes).

Não foi observada diferença estatística entre os momentos de avaliação em relação aos parâmetros SS, PC, $PS \geq 6\text{mm}$ e $NCI = 3-5\text{mm}$. Houve diferença estatisticamente significativa em relação à $PS = 4-5\text{mm}$ nas mulheres avaliadas em todos os três momentos de avaliação, demonstrada pelo teste de *Friedman* ($P = 0,02$). O resultado não foi confirmado na comparação entre dois momentos pelo teste de *Wilcoxon*.

Tabela 1. Parâmetros periodontais clínicos no segundo trimestre da gestação, 48h após o parto e 8 semanas após o parto.

| Variável | 2º trimestre (n = 31) | 48h pós-parto (n = 24) | 8 semanas pós-parto (n = 18) | Teste de <i>Friedman</i> | Teste de <i>Wilcoxon</i> | | |
|-----------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---|--|--------------------------------------|
| | | | | | 2º trimestre versus 48h pós-parto | 2º trimestre versus 8 semanas pós-parto | 48h versus 8 semanas pós-parto |
| Dentes com SS (%) | 44,5 ± 25,2 7,7 – 100 | 36,8 ± 22,8 3,0 – 76,0 | 40,6 ± 22,3 11,1 – 92,9 | <i>P</i> =0,17 | <i>P</i> =0,08 | <i>P</i> =0,22 | <i>P</i> =0,68 |
| Dentes com PC (%) | 8,4 ± 11,0 0 – 36,0 | 9,3 ± 11,5 0 – 36,0 | 7,9 ± 10,9 0 – 35,7 | <i>P</i> =0,09 | <i>P</i> =0,44 | <i>P</i> =0,09 | <i>P</i> =0,10 |
| Dentes com PS = 4-5 mm (%) | 4,7 ± 14,3 0 – 64,0 | 1,2 ± 4,0 0 – 18,5 | 0,3 ± 1,6 0 – 7,4 | <i>P</i>=0,02 | <i>P</i> =0,07 | <i>P</i> =0,07 | <i>P</i> =0,11 |
| Dentes com PS ≥ 6 mm (%) | 0,2 ± 0,9 0 – 4 | 0 | 0 | <i>P</i> =0,37 | <i>P</i> =0,32 | <i>P</i> =0,32 | <i>P</i> =1,00 |
| Dentes com NCI = 3-5 mm (%) | 2,0 ± 8,8 0 – 48,1 | 2,1 ± 10,0 0 – 48,1 | 2,2 ± 10,2 0 – 48,1 | <i>P</i> =0,13 | <i>P</i> =0,18 | <i>P</i> =0,18 | <i>P</i> =1,00 |

*SS = sangramento à sondagem; PC = presença de cálculo; PS = profundidade de sondagem; NCI = nível clínico de inserção; DP = desvio padrão; n = número.

Parâmetros microbiológicos

A Tabela 2 apresenta os valores para a contagem bacteriana total e dos oito periodontopatógenos verificados no biofilme subgengival das mulheres no segundo trimestre da gestação e no pós-parto.

Os testes de *Friedman* e *Wilcoxon* não verificaram diferença estatisticamente significativa na contagem bacteriana total durante a gestação e o pós-parto.

Foi verificada uma redução significativa para *P. nigrescens* ao longo do acompanhamento longitudinal, quando os três momentos de avaliação foram comparados ($P < 0,05$, teste de *Friedman*). O teste de *Wilcoxon* também demonstrou diferença significativa em relação ao mesmo micro-organismo quando os momentos de avaliação foram comparados dois a dois. Foi observada maior abundância de *C. rectus* durante o segundo trimestre da gestação, comparado com o exame de 48h após o parto ($P < 0,05$). Números significativamente maiores de *P. intermedia* foram verificados 48h após o parto, em comparação com o exame de oito semanas após o parto ($P < 0,05$, teste de *Wilcoxon*).

Tabela 2. Média, desvio padrão (DP) e amplitude dos valores da contagem bacteriana total e de cada periodontopatógeno no segundo trimestre da gestação, 48h após o parto e 8 semanas após o parto.

| Contagem bacteriana (cel x 10 ⁷ /g) | 2º trimestre (n = 31) | 48h pós-parto (n = 24) | 8 semanas pós-parto (n = 18) | Teste de Friedman | Teste de Wilcoxon | | |
|---|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------|---|--|--------------------------------------|
| | | | | | 2º trimestre versus 48h pós-parto | 2º trimestre versus 8 semanas pós-parto | 48h versus 8 semanas pós-parto |
| Contagem bacteriana total | 513,8 ± 207,2 179,6 – 982,3 | 521,1 ± 228,9 226,4 – 1161,9 | 520,5 ± 168,8 227,8 – 805,2 | P=0,16 | P=0,28 | P=0,23 | P=0,08 |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | 8,9 ± 11,2 0 – 56,4 | 7,9 ± 10,7 0 – 53,6 | 11,2 ± 10,6 2,0 – 42,2 | P=0,93 | P=0,91 | P=0,52 | P=0,31 |
| <i>T. forsythia</i> | 21,5 ± 17,7 2,5 – 74,9 | 19,9 ± 14,1 4,9 – 51,6 | 20,1 ± 14,1 6,7 – 50,4 | P=0,41 | P=0,82 | P=0,31 | P=0,08 |
| <i>C. rectus</i> | 12,8 ± 12,9 0 – 43,9 | 10,5 ± 7,8 1,2 – 31,2 | 9,4 ± 7,9 0,8 – 31,6 | P=0,32 | P=0,44 | P=0,04 | P=0,16 |
| <i>P. gingivalis</i> | 19,6 ± 32,8 0 – 181,0 | 17,9 ± 24,8 2,1 – 130,0 | 11,6 ± 6,1 2,1 – 22,9 | P=0,24 | P=0,35 | P=0,91 | P=0,43 |
| <i>T. denticola</i> | 14,2 ± 12,7 0 – 59,2 | 14,0 ± 12,2 0,8 – 59,2 | 12,1 ± 10,0 0 – 39,7 | P=0,24 | P=0,38 | P=0,96 | P=0,18 |
| <i>F. nucleatum</i> | 26,4 ± 25,6 0 – 133,0 | 25,1 ± 21,3 1,9 – 91,3 | 21,5 ± 16,1 4,4 – 52,6 | P=0,52 | P=0,06 | P=0,38 | P=0,20 |
| <i>P. intermedia</i> | 36,7 ± 87,1 0 – 474,0 | 34,0 ± 65,6 0,8 – 312,5 | 14,9 ± 14,1 3,6 – 50,2 | P=0,13 | P=0,06 | P=0,12 | P=0,01 |
| <i>P. nigrescens</i> | 19,6 ± 18,3 0 – 57,8 | 17,9 ± 15,6 0 – 54,8 | 17,0 ± 15,0 2,4 – 53,4 | P=0,01 | P=0,01 | P=0,04 | P=0,01 |

Discussão

Os resultados do presente estudo, realizado em mulheres saudáveis, com gestação normal e sem complicações, trazem novas informações sobre as alterações na microbiota subgingival durante a gestação, verificada pela técnica da hibridização *in situ* fluorescente.

Embora em um estudo anterior com a mesma população não tenha sido encontrada diferença em relação aos parâmetros clínicos entre um grupo de gestantes e não gestantes (MACHADO et al., 2012), neste estudo foi observada maior presença de dentes com sítios com PS = 4-5 mm nas mulheres no segundo trimestre da gestação em comparação com o pós-parto, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística quando os momentos de avaliação foram comparados dois a dois. A presença de edema gengival com formação de falsas

bolsas periodontais pode explicar esta situação (ADRIAENS et al., 2009; GÜNCÜ; TÖZÜM; CAGLAYAN, 2005; GÜRISOY et al., 2008).

Dentre os periodontopatógenos avaliados, no presente estudo, foram encontradas alterações estatisticamente significativas em relação a *P. nigrescens*, *P. intermedia* e *C. rectus*.

O *P. nigrescens* surgiu da divisão do *Prevotella intermedia sensu lato* (anteriormente denominado *Bacteroides intermedius*), em *P. intermedia* e *P. nigrescens* (SHAH; GHARBIA, 1992). Sugere-se que esta bactéria é encontrada mais comumente em sítios saudáveis (GMUR; GUGGENHEIM, 1994; MÄTTÖ et al., 1996), como é o caso da maioria das mulheres na presente amostra. Outros autores, entretanto, sugerem que *P. nigrescens* é mais comum em crianças e em indivíduos com doença periodontal e/ou infecções endodônticas (KUHNERT et al., 2002; PEARCE et al., 2000). Gürsoy et al. (2009) relataram, pela primeira vez, uma maior frequência de *P. nigrescens*, ao invés de *P. intermedia*, em gestantes sem doença periodontal. Entretanto, Adriaens et al. (2009), em um estudo longitudinal, não encontraram diferença deste periodontopatógeno durante a gestação e pós-parto. Em nosso estudo anterior (MACHADO et al., 2012), não observamos diferença significativa entre os níveis desta bactéria em gestantes e não gestantes, apesar de uma maior prevalência da mesma durante a gestação. Vale ressaltar que outros estudos que verificaram alterações na composição da microbiota periodontopatogênica durante a gestação não avaliaram a presença de *P. nigrescens*, pela dificuldade de diferenciação das mesmas pela técnica de cultura (GÜRISOY et al, 2009).

Por outro lado, desde a década de 1980, o periodontopatógeno que tem sido mais frequentemente associado à gestação é o *P. intermedia*. Um aumento significativo no nível desta bactéria tem sido relatado em gestantes, principalmente no segundo trimestre gestacional (CARRILLO-DE-ALBORNOZ et al., 2010; KORNMAN; LOESCHE, 1980; JENSEN; LILJEMARK; BLOOMQUIST, 1981) Entretanto, estes resultados ainda são bastante controversos, tendo em vista que alguns estudos não encontraram as mesmas alterações em gestantes.^{8,17,25,26} Além disso, sugere-se que esta bactéria pode contribuir para o aumento da doença periodontal durante a gestação. Raber-Durlacher et al. (1994) observaram um aumento no percentual de *P. intermedia* no biofilme subgingival durante uma

indução experimental de gengivite em gestante. No entanto, nenhum aumento foi observado durante o mesmo procedimento realizado no pós-parto.

O *C. rectus* pode estar associado com várias formas de doença periodontal e com o aumento no risco de nascimentos prematuros e de baixo peso (MITCHELL-LEWIS et al., 2001; MADIANOS et al., 2001; BUDUNELLI et al., 2005; LIN et al., 2007). Existem evidências de que o *C. rectus* produz vários fatores de virulência, inclusive uma leucotoxina, que podem aumentar a expressão de vários mediadores inflamatórios pelas células do hospedeiro (GILLESPIE et al., 1993; YOKOYAMA et al., 2005; YOKOYAMA et al., 2008). Yokoyama et al. (2005), em um estudo *in vitro*, verificaram que o estradiol e a progesterona podem estimular significativamente o crescimento do *C. rectus*. Posteriormente, em outro estudo dos mesmos autores (YOKOYAMA et al., 2008), foram encontrados maiores níveis de *C. rectus* em gestantes, quando comparadas com não gestantes.

Apesar de diferenças significativas terem sido encontradas somente em relação aos três periodontopatógenos citados anteriormente, vale ressaltar que todos os micro-organismos avaliados, exceto o *A. actinomycetencomitans*, foram encontrados com maior frequência durante o segundo trimestre gestacional. Tal fato reforça uma das mais sólidas hipóteses de que as alterações fisiológicas que ocorrem durante a gestação podem aumentar os níveis de bactérias periodontopatogênicas na cavidade bucal de mulheres durante a gestação.

Algumas limitações do presente estudo podem, evidentemente, ser apontadas, as quais incluem o tamanho da amostra e a presença de mulheres que não apresentavam doença periodontal grave, o que dificultou a realização de correlações entre a gravidade da doença e a microbiota subgengival.

O real papel de cada micro-organismo periodontopatogênico na gestante, seja exacerbando ou induzindo a doença periodontal, seja interferindo na evolução ou desfecho da gestação, ainda precisa ser mais bem esclarecido em estudos futuros. As técnicas moleculares, como a técnica de FISH, utilizada neste estudo, podem facilitar a realização de investigações neste sentido, visto que a maioria dos micro-organismos orais é de difícil cultivo. Além disso, esta técnica tem se mostrado eficaz para a identificação, visualização e quantificação de várias bactérias periodontopatogênicas (MACHADO et al., 2012; MOTER; GÖBEL, 2000).

Somente quando houver um entendimento claro sobre as causas, medidas terapêuticas e preventivas poderão ser desenvolvidas para a identificação de

gestantes de risco para a doença periodontal, beneficiando os desfechos da gestação e do parto e, melhorando assim, a qualidade de vida da população. Entretanto, concorda-se que a manutenção da saúde bucal é sempre benéfica e a manutenção da saúde bucal deve ser estimulada durante a gravidez como parte do protocolo de atendimento pré-natal

6.3 ALTERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS NA SALIVA DE E MULHERES NA GESTAÇÃO E NO PÓS-PARTO E DE UM GRUPO DE NÃO GESTANTES

RESULTADOS

Características gerais da amostra

A média de idade das mulheres foi de $26,7 \pm 2,5$ anos para o grupo de gestantes e de $27,4 \pm 2,2$ anos para o de não gestantes. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à idade ($P=0,34$), etnia ($P=0,83$), estado civil ($P=0,16$), escolaridade ($P=0,27$) e classe social ($P=0,18$).

A média da idade gestacional no grupo das gestantes foi de $19,0 \pm 3,3$ semanas. Das 31 mulheres avaliadas no segundo trimestre gestacional, 24 foram avaliadas 48 horas após o parto e 22 foram avaliadas oito semanas após o parto. Os motivos da perda de algumas participantes nos exames de acompanhamento foram desistência por motivos pessoais (perda de interesse ou falta de tempo), mudança de cidade e impossibilidade de localização das mulheres pelos pesquisadores. Exame médico realizado por obstetras confirmou que todas as crianças nasceram a termo (média $39,0 \pm 1,47$ semanas, amplitude 37-41 semanas) e com peso normal (média de $3,283 \pm 0,467$ kg, amplitude 2,525-4,220 kg). Em ambos os exames de acompanhamento após o parto, as mulheres estavam realizando o aleitamento materno.

Parâmetros clínicos

Comparação entre os grupos de gestantes no segundo trimestre e não gestantes

Os grupos de gestantes e não gestantes apresentaram condições periodontais clínicas semelhantes. A maioria das mulheres de ambos os grupos não apresentou doença periodontal, entretanto, todas as mulheres apresentaram inflamação gengival (presença de sangramento à sondagem). De acordo com a classificação de Lopez et al.¹⁷, seis gestantes no segundo trimestre gestacional e quatro não gestantes foram consideradas doentes, sem diferença significativa entre elas ($P=0,95$).

A Tabela 2 apresenta as médias, desvio padrão (DP) e amplitude para o número de dentes avaliados e percentual de dentes com pelo menos um sítio com

SS, PC, PS = 4-5 mm, PS \geq 6 mm e NCI = 3-5 mm, em gestantes (segundo trimestre) e não gestantes.

Comparação longitudinal durante a gestação e o pós-parto

A Tabela 2 apresenta a avaliação longitudinal dos parâmetros periodontais clínicos avaliados (SS, PC, PS = 4-5 mm, PS \geq 6 mm e NCI = 3-5 mm) no segundo trimestre da gestação e nos dois exames após o parto. Houve diferença estatisticamente significativa em relação à presença de PS=4-5 mm nas mulheres avaliadas em todos os três momentos de avaliação, demonstrada pelo teste de *Friedman* ($P=0,02$). Este resultado não foi confirmado na comparação entre dois momentos pelo teste de *Wilcoxon*.

Tabela 2.

Parâmetros periodontais clínicos nos três momentos de avaliação do grupo de gestantes e no grupo de não gestantes.

| Variável | Grupo de gestantes | | | Grupo de não gestantes (n=20) |
|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | 2º trimestre (n=31) | 48h pós-parto (n=24) | 8 semanas pós-parto (n=22) | |
| | Média \pm DP Amplitude | Média \pm DP Amplitude | Média \pm DP Amplitude | |
| Número de dentes | 27,0 \pm 1,3 24 – 28 | 27,0 \pm 1,3 24 – 28 | 27,0 \pm 1,3 24 – 28 | 26,1 \pm 2,2 21 – 28 |
| Dentes com SS (%) | 44,5 \pm 25,2 7,7 – 100 | 36,8 \pm 22,8 3,0 – 76,0 | 40,6 \pm 22,3 11,1 – 92,9 | 49,3 \pm 29,2 3,6 – 100 |
| Dentes com PC (%) | 8,4 \pm 11,0 0 – 36,0 | 9,3 \pm 11,5 0 – 36,0 | 7,9 \pm 10,9 0 – 35,7 | 13,4 \pm 20,2 0 – 80,0 |
| Dentes com PS=4-5 mm (%)** | 4,7 \pm 14,3 0 – 64,0 | 1,2 \pm 4,0 0 – 18,5 | 0,3 \pm 1,6 0 – 7,4 | 1,7 \pm 4,1 0 – 14,3 |
| Dentes com PD \geq 6 mm (%) | 0,2 \pm 0,9 0 – 4 | 0 | 0 | 0,2 \pm 0,9 0 – 4,0 |
| Dentes com NCI=3-5 mm (%) | 2,0 \pm 8,8 0 – 48,1 | 2,1 \pm 10,0 0 – 48,1 | 2,2 \pm 10,2 0 – 48,1 | 0 |

*SS = sangramento à sondagem; PC = presença de cálculo; PS = profundidade de sondagem; NCI = nível clínico de inserção; DP = desvio padrão; n = número.

**Comparação intragrupo: $P \leq 0,05$, teste de *Friedman*. $P \geq 0,05$, teste de *Wilcoxon*.

Parâmetros microbiológicos

Comparação entre os grupos de gestantes no segundo trimestre e não gestantes

Em relação à contagem bacteriana total, não houve diferença estatisticamente significativa entre as gestantes no segundo trimestre em comparação com o grupo de não gestantes (Tabela 3).

A comparação da contagem bacteriana total e de cada espécie nos três momentos de avaliação, comparando o grupo de gestantes no segundo trimestre e o grupo de não gestantes encontra-se na Tabela 3. Foram observados maiores valores de *P. intermedia* nas gestantes, quando comparadas com o grupo controle de não gestantes ($P \leq 0,001$).

Tabela 3. Média, desvio padrão e amplitude da contagem bacteriana total e de cada espécie avaliada nos grupo de gestantes, nos três momentos de avaliação, e no grupo de não gestantes.

| Contagem bacteriana (Cel x 10 ⁵ /mL) | Grupo de gestantes | | | Grupo de não gestantes (n=20) |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| | 2º trimestre (n=31) | 48h pós-parto (n=24) | 8 semanas pós-parto (n=22) | |
| | Média ± DP Amplitude | Média ± DP Amplitude | Média ± DP Amplitude | |
| Contagem bacteriana total | 235,0 ± 204,5 60,4 – 825,7 | 235,5 ± 171,6 60,5 – 712,1 | 221,7 ± 171,3 54,1 – 712,7 | 252,4 ± 104,3 89,8 – 467,6 |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | 1,50 ± 1,87 0,0 – 9,2 | 1,71 ± 1,75 0,0 – 6,7 | 2,03 ± 1,82 0,0 – 7,3 | 1,50 ± 1,57 0,0 – 4,8 |
| <i>T. forsythia</i> | 3,95 ± 3,69 0,0 – 13,0 | 3,55 ± 2,93 0,0 – 10,6 | 3,02 ± 2,05 0,1 – 6,9 | 4,15 ± 3,78 0,0 – 14,1 |
| <i>C. rectus</i> | 3,14 ± 3,72 0,0 – 15,9 | 2,13 ± 1,42 0,0 – 4,8 | 1,93 ± 1,94 0,0 – 9,3 | 2,20 ± 1,18 0,2 – 9,9 |
| <i>P. gingivalis</i> | 3,01 ± 2,76 0,0 – 10,6 | 3,41 ± 2,88 0,0 – 10,7 | 2,77 ± 2,21 0,0 – 7,0 | 2,98 ± 1,68 0,6 – 6,8 |
| <i>T. denticola</i> | 3,28 ± 2,90 0,0 – 12,8 | 3,35 ± 2,73 0,0 – 12,9 | 2,74 ± 1,72 0,4 – 6,4 | 3,44 ± 2,61 0,0 – 10,4 |
| <i>F. nucleatum</i> | 4,09 ± 3,57 0,2 – 11,3 | 3,66 ± 3,26 0,0 – 10,7 | 2,16 ± 1,32 0,0 – 4,9 | 5,45 ± 5,22 0,4 – 16,0 |
| <i>P. intermedia</i> *,**,***, **** | 6,37 ± 4,54 0,9 – 17,6 | 4,37 ± 3,06 0,6 – 12,7 | 1,49 ± 1,10 0,0 – 4,7 | 1,72 ± 1,89 0,1 – 8,0 |
| <i>P. nigrescens</i> ** ,***, **** | 4,46 ± 3,82 0,2 – 15,8 | 3,44 ± 3,00 0,0 – 13,1 | 1,89 ± 1,41 0,0 – 4,4 | 2,83 ± 2,11 0,3 – 8,3 |

* $P < 0,001$ para comparação entre gestantes no 2º trimestre e não gestantes, teste de Mann-Whitney.

** $P \leq 0,001$ para comparação entre os três momentos de avaliação no grupo de gestantes, teste de Friedman.

*** $P \leq 0,001$ para comparação entre exame inicial (2º trimestre) e exame de 8 semanas pós-parto, teste de Wilcoxon.

**** $P < 0,02$ para comparação entre exame inicial (2º trimestre) e exame de 48h pós-parto e para comparação entre exame de 48h pós-parto e 8 semanas pós-parto, teste de Wilcoxon.

Comparação longitudinal durante a gestação e o pós-parto

Os testes de Friedman e Wilcoxon não demonstraram alterações significativas na contagem bacteriana total durante a gestação e o pós-parto. Foi observada uma redução significativa de *P. intermedia* e *P. nigrescens* ao longo do acompanhamento

longitudinal realizado, quando comparados os três momentos de avaliação, demonstrada pelo teste de *Friedman* ($P \leq 0,001$). O teste de *Wilcoxon* também demonstrou diferença significativa em relação aos mesmos micro-organismos quando foram comparados dois momentos da avaliação, com maiores valores de periodontopatógenos durante o segundo trimestre da gestação (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Este parece ser o primeiro estudo longitudinal que utiliza a saliva e a técnica da hibridização *in situ* fluorescente para quantificar a presença de periodontopatógenos durante a gestação e o pós-parto.

O diagnóstico de bactérias periodontopatogênicas pela saliva se baseia na ideia de que a mesma é a fonte imediata de bactérias para o biofilme dental, além de abrigar semelhantes níveis de micro-organismos aos da região subgengival¹¹. Da mesma forma, altas contagens salivares de periodontopatógenos podem implicar na presença ou risco de doença periodontal (UMEDA et al., 1998; SAYGUN et al., 2011). Além disso, as análises salivares apresentam uma coleta simples, rápida e com ausência de dor ou incômodo para o paciente (SAKAMTO, et al., 2002; SAYGUN et al., 2011; YOKOYAMA et al., 2008). Umeda et al. (1998) encontraram relação estatisticamente significativa entre a presença de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. denticola* em amostras de saliva e bolsa periodontal. Os outros micro-organismos avaliados por estes pesquisadores (*A. actinomycetencomitans* e *T. forsythia*) foram encontrados de forma mais frequente na saliva do que nas bolsas periodontais da amostra estudada. A partir destes resultados, podemos supor que os periodontopatógenos avaliados em nosso estudo podem, em sua maioria, predizer a presença destes micro-organismos na microbiota subgengival.

As amostras salivares foram analisadas pela técnica de FISH. Esta técnica molecular não necessita de uma cultura prévia e fornece resultados quantitativos diretos, com identificação, visualização e contagem das células microbianas individualmente pelas informações da microscopia, além de ser considerada uma técnica rápida e objetiva (GMUR; THURNHEER, 2002; MOTER; GÖBEL, 2000). Estudos anteriores em gestantes utilizaram métodos clássicos de cultura (CARRILLO-DE-ALBORNOZ, et al., 2010; KORNMAN; LOESCHE, 1980; JENSEN; LILJEMARK; BLOOMQUIST, 1981; JOSSON; HOWLAND; BOWDEN, 1988;

MURAMATSU; TAKAESU, 1994), os quais são dificultados pela complexidade da microbiota periodontal, além de serem trabalhosos, demorados e sujeitos a erros estatísticos e metodológicos (CARRILLO-DE-ALBORNOZ, 2010; MOTER; GÖBEL, 2000; GERSDORF; PELZ; GÖBEL, 1993), ou técnicas baseadas em PCR ou hibridização DNA-DNA (ADRIAENS et al., 2009; GÜRISOY et al., 2009; YOKOYAMA et al., 2008), que fornecem resultados qualitativos, ou no máximo, semi-quantitativos, além de não oferecerem informações a respeito da morfologia e da distribuição espacial dos micro-organismos (GMUR; THURNHEER, 2002).

A população estudada foi composta por mulheres saudáveis, com características sociodemográficas semelhantes e ausência de extremos de idade para facilitar a comparação entre os grupos de gestantes e não gestantes e evitar que fatores confundidores pudessem interferir na presença de doença ou na contagem dos micro-organismos. Além disso, para melhor avaliar os parâmetros clínicos e microbiológicos durante a gestação, as mulheres do grupo de gestantes foram reavaliadas em dois outros momentos após o parto (48 horas e oito semanas). A avaliação durante a gestação foi realizada no segundo trimestre por ser este o momento que apresenta as maiores alterações periodontais clínicas e microbiológicas relatadas na literatura (KORNMAN; LOESCHE, 1980; GÜRISOY et al., 2008; GÜRISOY et al., 2009). Vale ressaltar ainda que este é o trimestre no qual ocorre menor possibilidade de intercorrências durante a gestação e apresenta maior comodidade de realização do exame para as gestantes (SILK et al., 2008). A redução do número de avaliações em relação aos estudos anteriores objetivou evitar uma alta desistência das participantes durante o estudo longitudinal e possibilitar a manipulação do material por um único pesquisador.

Apesar de a doença periodontal ser relatada com maior frequência em gestantes, o presente estudo não encontrou alta prevalência desta doença nas mulheres avaliadas, tampouco diferença entre o grupo de gestantes e não gestantes, apesar de todas elas apresentarem inflamação gengival. Estudos anteriormente conduzidos mostraram maiores valores de sangramento gengiva (GÜRISOY et al, 2008; TAANI et al., 2003; TILAKARATNE et al., 2000) e profundidade de bolsa (TAANI et al., 2003; YOKOYAMA et al., 2008) em gestantes, quando comparadas com não gestantes. Entretanto, é importante salientar, que houve diferença significativa em relação à maior presença de dentes com sítios com PS=4-5mm nas mulheres no segundo trimestre da gestação em comparação com o

pós-parto, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística quando os momentos de avaliação foram comparados dois a dois. Em um estudo longitudinal, Gürsoy et al.(2008) também relataram maiores valores de profundidade de bolsa no segundo trimestre gestacional. Este fato pode ser explicado pela presença de edemas e falsas bolsas gengivais frequentemente encontrados durante a gestação, e não por uma ruptura tecidual propriamente dita (ADRIAENS et al., 2009).

Foram encontrados maiores números de *P. intermedia* na saliva das gestantes em comparação com as não gestantes, em concordância com estudos anteriormente conduzidos com amostras de biofilme subgengival (KORNMAN; LOESCHE, 1980; JENSEN; LILJEMARK; BLOOMQUIST, 1981; MURAMATSU; TAKAESU, 1994), confirmando a hipótese de que os hormônios sexuais femininos podem estimular o crescimento de certas bactérias. Além disso, da mesma forma que em outros estudos longitudinais (CARRILLO-DE-ALBORNOZ et al., 2010; KORNMAN; LOESCHE, 1980; GÜRISOY et al., 2009; RABER-DURLACHER et al., 1994) foi observada maior abundância de *P. intermedia* e *P. nigrescens* durante o segundo trimestre da gestação, quando comparadas com os valores após o parto.

Entretanto, é importante destacar que a comparação com outros estudos é dificultada pelo tipo de amostra aqui utilizada (saliva) e pela técnica de identificação e contagem das bactérias (FISH). Foram encontrados na literatura somente dois estudos (GÜRISOY, et al., 2009; YOKOYAMA et al, 2008) que utilizaram amostras salivares para diagnóstico de periodontopatógenos em gestantes. Em um estudo transversal, utilizando o PCR em tempo real para detectar bactérias periodontopatogênicas na saliva de gestantes e não gestantes, Yokoyama et al. (2008) encontraram maiores níveis de *C. rectus* em gestantes e os relacionaram com o aumento na concentração salivar de estradiol. Entretanto, não foram observadas diferenças ou correlações em relação aos outros micro-organismos avaliados, entre eles o *P. intermedia*. Por outro lado, Gürsoy et al. (2009), em um estudo longitudinal, observaram maiores contagens de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) de *P. intermedia sensu lato* (que posteriormente foram identificadas por PCR como sendo na maior parte *P. nigrescens* e não *P. intermedia*) durante a gestação quando comparadas com o pós-parto ou o grupo de não gestantes. No presente estudo, apesar de terem sido encontrados maiores valores de *C. rectus* durante a gestação, o resultado não foi estatisticamente significativo. Já os números de *P. intermedia* e *P. nigrescens* foram significativamente maiores no segundo

trimestre da gestação, apesar de não ter sido encontrada diferença em relação a *P. nigrescens* quando as gestantes no segundo trimestre foram comparadas com as não gestantes.

Estudos anteriores correlacionaram os elevados níveis dos periodontopatógenos com as altas concentrações de estrógeno e progesterona na saliva de gestantes (CARRILLO-DE-ALBORNOZ et al., 2010; YOKOYAMA et al., 2008). Todavia, não foi realizada dosagem hormonal das mulheres incluídas neste estudo, o que impede a comprovação desta correlação e pode ser apontado com uma limitação da presente investigação.

Níveis mais altos de periodontopatógenos, como o *P. intermedia* e *P. nigrescens*, podem favorecer o agravamento da doença periodontal em gestantes (CARRILLO-DE-ALBORNOZ et al., 2010; KORNMAN; LOESCHE, 1980; JENSEN; LILJEMARK; BLOOMQUIST, 1981; GÜRISOY, et al., 2009). Adicionalmente, sabe-se que os periodontopatógenos e seus fatores de virulência podem disseminar-se e induzir respostas inflamatórias além dos tecidos periodontais, sugerindo a associação desta doença com um maior risco de intercorrências sistêmicas, como os resultados adversos da gestação – nascimento prematuro, de baixo peso, pré-eclampsia e aborto (BOBETSIS et al., 2006; KATZ et al., 2006; XIONG et al., 2006). Segundo Han (2011), acumula-se evidência de que, em gestantes, bactérias orais podem deslocar-se diretamente para o útero, causando inflamação localizada e resultado adverso da gestação na presença ou na ausência de doença periodontal clínica. Esta transmissão não é limitada aos periodontopatógenos bem conhecidos, mas podem envolver também espécies comensais e deveria ser mais bem investigada em futuros estudos.

Outros estudos que utilizem saliva e técnicas moleculares quantitativas para o diagnóstico de periodontopatógenos em gestantes são necessários para uma melhor comparação e confirmação dos dados deste estudo. Também são necessários estudos com outras populações, incluindo gestantes que apresentem doença periodontal mais grave, para que possa ser mais bem esclarecido o real papel dos micro-organismos periodontopatogênicos no desenvolvimento ou agravamento da doença periodontal durante a gestação, na associação desta doença com resultados adversos da gestação, assim como na transmissão destas bactérias das mães para seus filhos.

Em conclusão, a gestação parece induzir um aumento nos números de *P. intermedia* e *P. nigrescens* na saliva, quantificadas pela técnica de FISH. No entanto, a redução destes periodontopatógenos após o parto poderia explicar, pelo menos em parte, porque a inflamação periodontal que ocorre durante a gestação é limitada à gengivite e não predispõe ou evolui para a periodontite.

7 CONCLUSÕES

- Os resultados confirmaram a hipótese de que ocorre uma alteração na microbiota durante a gestação para *P. nigrescens*, *P. intermedia* e *C. rectus* no biofilme subgengival e para *P. nigrescens* e *P. intermedia* na saliva.
- Não foi verificada diferença em relação aos parâmetros clínicos entre gestantes no segundo trimestre gestacional e não gestantes.
- No biofilme subgengival, não foi verificada diferença quantitativa em relação aos periodontopatógenos *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* entre gestantes no segundo trimestre gestacional e não gestantes.
- Na saliva, existe maior abundância de *P. intermedia* em gestantes no segundo trimestre gestacional, em comparação com o grupo controle de não gestantes.
- Somente pequena alteração nos parâmetros clínicos foi observada entre a gestação e o pós-parto. Ocorreu uma redução do percentual de dentes com profundidade de sondagem entre 4-5 mm desde a gestação até o pós-parto, mas a mesma não foi confirmada na comparação entre dois momentos.
- Verificou-se uma alteração na microbiota subgengival durante a gestação em relação a *P. nigrescens*, *P. intermedia* e *C. rectus*. Os números de *P. nigrescens* diminuíram ao longo dos três momentos avaliados. Maior abundância de *C. rectus* foi observada durante o segundo trimestre, em comparação com o exame de oito semanas após o parto, assim como números mais altos de *P. intermedia* foram observados 48 horas após o parto, em comparação com o exame de oito semanas após o parto.
- Uma redução de *P. intermedia* e *P. nigrescens* na saliva foi verificada ao longo do acompanhamento longitudinal desde a gestação até o pós-parto, com maior abundância observada durante o segundo trimestre gestacional.

REFERÊNCIAS*

- ABEP – Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa, 2003. **Critério de Classificação Econômica Brasil/2003**. Disponível em: <http://www.abep.org/codigosguia/ABEP_CCEB.pdf> Acesso em 27 de jun. 2007.
- ADRIAENS, L. M. et al. Does pregnancy have an impact on the subgingival microbiota? **Journal of periodontology**, Chicago, v. 80, n. 1, p. 72-81, Jan. 2009.
- ALBANDAR, J. M. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 29, n. 1, p. 177-206, Apr. 2002.
- ALBANDAR, J. M.; RAMS, T. E. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 29, n. 1, p. 7-10, Apr. 2002.
- AMAR, S.; CHUNG, K. M. Influence of hormonal variation on the periodontium in women. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 6, n. 1, p. 79-87, Oct. 1994.
- ARAKAWA, S. et al. Novel apoptosis-inducing activity in *Bacteroides forsythus*: a comparative study with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infection and immunity**, Washington, v. 68, n. 8, p. 4611-4615, Aug. 2000.
- ASHIMOTO, A. et al. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral microbiology and immunology**, Copenhagen, v. 11, n. 4, p. 266-273, Aug. 1996.
- BARAK, S. et al. Evidence of periopathogenic microorganisms in placentas of women with preeclampsia. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 78, n. 4, p. 670-676, Apr. 2007.
- BOBETSIS, Y. A.; BARROS, S. P.; OFFENBACHER, S. Exploring the relationship between periodontal disease and pregnancy complications. **The Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 137, Suppl. 10, p. 7S-13S, Oct. 2006.
- BOLSTAD, A. I.; JENSEN, H. B.; BAKKEN, V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 9, n. 1, p. 55-71, Jan. 1996.
- BOTTARI, B. et al. Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 73, n. 3, p. 485-494, Dec. 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. **Projeto SB Brasil: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003. Resultados principais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

* Formatação as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NRB 6023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área Técnica de Saúde Bucal. **Projeto SB 2000: condições de saúde bucal da população brasileira no ano 2000. Manual do examinador.** Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BUDUNELI, N. et al. Evaluation of the relationship between smoking during pregnancy and subgingival microbiota. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 32, n. 1, p. 68-74, Jan. 2005a.

BUDUNELI, N. et al. Periodontal infections and pre-term low birth weight: a case-control study. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 32, n. 2, p. 174-181, Feb. 2005b.

CARRILLO-DE-ALBORNOZ, A. E. et al. Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 37, n. 3, p. 230-240, Mar. 2010.

CESAR, D. E. **Estrutura e dinâmica do bacterioplâncton e suas relações com nutrientes inorgânicos e predação do estuário da Lagoa dos Patos / RS.** 2002. 151f. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Oceanografia Biológica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2002.

CHAN, E. C.; MCLAUGHLIN, R. Taxonomy and virulence of oral spirochetes. **Oral microbiology and immunology**, Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 1-9, Feb. 2000.

COLLINS, J. G. et al. Effects of a *Porphyromonas gingivalis* infection on inflammatory mediator response and pregnancy outcome in hamsters. **Infection and immunity**, Washington, v. 62, n. 10, p. 4356-4361, Oct. 1994.

COLOMBO, A. V. et al. Identification of intracellular oral species within human crevicular epithelial cells from subjects with chronic periodontitis by fluorescence *in situ* hybridization. **Journal of periodontal research**, Copenhagen, v. 42, n. 3, p. 236-243, Jun. 2007.

COTTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridization. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5116-5122, Dec. 2000.

DAVEY, M. E.; COSTERTON, J. W. Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 42, n. 1, p. 13-26, Oct. 2006.

DEL'DUCA, A.; CÉSAR, C. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) como opção de ferramenta em ecologia microbiana aquática. **Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 6-9, maio. 2007.

DELONG, E. F.; WICKHAM, G. S.; PACE, N. R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. **Science**, Washington, v. 243, n. 4896, p. 1360-1363, Mar. 1989.

- DORTBUDAK, O. et al. Periodontitis, a marker of risk in pregnancy for preterm birth. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 32, n. 1, p. 45-52, Jan. 2005.
- EPSTEIN, S. S.; ROSSEL J. Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. **Marine ecology progress series**, Oldendorf, v. 117, p. 289-298, Feb. 1995.
- FENG, Z.; WEINBERG, A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 40, n. 1, p. 50-76, Feb. 2006.
- FERGUSON, J. E. et al. Should we treat periodontal disease during gestation to improve pregnancy outcomes? **Clinical obstetrics and gynecology**, Hagerstown, v. 50, n. 2, p. 454-467, Jun. 2007.
- FLEMMIG, T. F. Periodontitis. **Annals of periodontology**, Chicago, v. 4, n. 1, p. 32-38, Dec. 1999.
- GERSDORF, H. et al. Identification of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque from patients with advanced periodontitis. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 31, n. 4, p. 941-946, Apr. 1993.
- GERSDORF, H.; PELZ, K.; GÖBEL, U. B. Fluorescence *in situ* hybridization for direct visualization of gram-negative anaerobes in subgingival plaque samples. **FEMS immunology and medical microbiology**, Amsterdam, v. 6, n. 2-3, p. 109-114, Mar. 1993.
- GILLESPIE, M. J.; SMUTKO, J.; HARASZTHY, G. G., et al. Isolation and partial characterization of the *Campylobacter rectus* cytotoxin. **Microbial pathogenesis**, London, v. 14, n. 3, p. 203-215, Mar. 1993.
- GIOVANNONI, S. J. et al. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. **Journal of bacteriology**, Baltimore, v. 170, n. 2, p. 720-726, Feb. 1988.
- GMÜR, R.; GUGGENHEIM, B. Interdental supragingival plaque--a natural habitat of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, and *Prevotella nigrescens*. **Journal of dental research**, Chicago, v. 73, n. 8, p. 1421-1428, Aug. 1994.
- GMÜR, R. et al. Gingival crevice microbiota from Chinese patients with gingivitis or necrotizing ulcerative gingivitis. **European journal of oral sciences**, Copenhagen, v. 112, n. 1, p. 33-41, Feb. 2004.
- GMÜR, R.; LÜTHI-SCHALLER, H. A combined immunofluorescence and fluorescent *in situ* hybridization assay for single cell analyses of dental plaque microorganisms. **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v. 69, n. 2, p. 402-405, Dec. 2007.

- GMÜR, R.; THURNHEER, T. Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical specimens. **Microbiology**, Reading, v. 148, n. 5, p. 1379-1387, May. 2002.
- GROSSI, S. G. et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 65, n. 3, p. 260-267, Mar. 1994.
- GROSSI, S. G. et al. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 66, n. 1, p. 23-29, Jan. 1995.
- GUILLOT, E.; MOUTON, C. PCR-DNA probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia sensu stricto* and *Prevotella nigrescens*. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 35, n. 7, p. 1876-1882, Jul. 1997.
- GÜNCÜ, G. N.; TÖZÜM, T. F.; CAGLAYAN, F. Effects of endogenous sex hormones on the periodontium-review of literature. **Australian dental journal**, Sydney, v. 50, n. 3, p. 138-145, Sep. 2005.
- GÜRISOY, M. et al. Clinical changes in periodontium during pregnancy and post partum. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 35, p. 576-583, 2008.
- GÜRISOY, M. et al. Does the frequency of *Prevotella intermedia* increase during pregnancy? **Oral microbiology and immunology**, Copenhagen, v. 24, n. 4, p. 299-303, Aug. 2009.
- HAFFAJEE, A. D. et al. Microbial complexes in supragingival plaque. **Oral microbiology and immunology**, Copenhagen, v. 23, n. 3, p. 196-205, Jun. 2008.
- HAN, Y.W. Can oral bacteria cause pregnancy complications? **Womens Health**. v. 7, p. 401-404, 2011.
- HASEGAWA, K. et al. Associations between systemic status, periodontal status, serum cytokine levels, and delivery outcomes in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 74, n. 12, p. 1764-1770, Dec. 2003.
- JARJOURA, K. et al. Markers of periodontal infection and preterm birth. **American journal of obstetrics and gynecology**, St. Louis, v. 192, n. 2, p. 513-519, Feb. 2005.
- JENSEN, J.; LILJEMARK, W.; BLOOMQUIST, C. The effect of female sex hormones on subgingival plaque. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 52, n. 10, p. 599-602, Oct. 1981.
- JONSSON, R.; HOWLAND, B. E.; BOWDEN, G. H. Relationships between periodontal health, salivary steroids, and *Bacteroides intermedius* in males, pregnant and non-pregnant women. **Journal of dental research**, Chicago, v. 67, n. 8, p. 1062-1069, Aug. 1988.

- KATZ, J. et al. Oral health and preterm delivery education: a new role for the pediatric dentist. **Pediatric dentistry**, Chicago, v. 28, n. 6, p. 494-498, Oct. 2006.
- KINANE, D. F. Causation and pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 25, n. 1, p. 8-20, Feb. 2001.
- KORNMAN, K. S.; LOESCHE, W. J. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. **Infection and immunity**, Washington, v. 35, n. 1, p. 256-263, Jan. 1982.
- KORNMAN, K. S.; LOESCHE, W. J. The subgingival microbial flora during pregnancy. **Journal of periodontal research**, Copenhagen, v. 15, n. 2, p. 111-122, Mar. 1980.
- KUHNERT, P. et al. Phylogenetic analysis of *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* clinical strains reveals a clear species clustering. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Reading, v. 52, n. 4, p. 1391-1395, Jul. 2002.
- LAMONT, R. J.; JENKINSON, H. F. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, Washington, v. 62, n. 4, p. 1244-1263, Dec. 1998.
- LAMONT, R. J.; JENKINSON, H. F. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. **Oral microbiology and immunology**, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 341-349, Dec. 2000.
- LAPP, C. A.; THOMAS, M. E.; LEWIS, J. B. Modulation by progesterone of interleukin-6 production by gingival fibroblasts. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 66, n. 4, p. 279-284, Apr. 1995.
- LIN, D. et al. Persistently high levels of periodontal pathogens associated with preterm pregnancy outcome. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 78, n. 5, p. 833-841, May. 2007.
- LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 1048 p.
- LOPEZ, N. J. et al. Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. **Journal of dental research**, Chicago, v. 81, n. 1, p. 58-63, Jan. 2002.
- LORENCINI, M. et al. A new paradigm in the periodontal disease progression: gingival connective tissue remodeling with simultaneous collagen degradation and fibers thickening. **Tissue & cell**, Edinburgh, v. 41, n. 1, p. 43-50, Feb. 2009.
- LOY, A. et al. probeBase-an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. **Nucleic acids research**, London, v. 35, n. Database issue, p. D800-804, Jan. 2007.

MACHADO, F. C. et al. Detection and enumeration of periodontopathogenic bacteria in subgingival biofilm of pregnant women. *Brazilian Oral Research*, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 443-9, Sep-Oct, 2012.

MACHTEI, E. E. et al. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 26, n. 6, p. 374-380, Jun. 1999.

MACUCH, P. J.; TANNER, A. C. *Campylobacter* species in health, gingivitis, and periodontitis. **Journal of dental research**, Chicago, v. 79, n. 2, p. 785-792, Feb. 2000.

MADIANOS, P. N. et al. Maternal periodontitis and prematurity. Part II: Maternal infection and fetal exposure. **Annals of periodontology**, Chicago, v. 6, n. 1, p. 175-182, Dec. 2001.

MARIOTTI, A. Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. **Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists**, Boca Raton, v. 5, n. 1, p. 27-53, 1994.

MARKOU, E. et al. The influence of sex steroid hormones on gingiva of women. **The open dentistry journal**, Hilversum, v. 3, p. 114-119, Jun. 2009.

MÄTTÖ, J. et al. Distribution and genetic analysis of oral *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. **Oral microbiology and immunology**, Copenhagen, v. 11, n. 2, p. 96-102, Apr. 2000.

MITCHELL-LEWIS, D. et al. Periodontal infections and pre-term birth: early findings from a cohort of young minority women in New York. **European journal of oral sciences**, Copenhagen, v. 109, n. 1, p. 34-39, Feb. 2001.

MOTER, A. et al. Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 36, n. 5, p. 1399-1403, May. 1998.

MOTER, A.; GÖBEL, U. B. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 85-112, Jul. 2000.

MURAMATSU, Y.; TAKAESU, Y. Oral health status related to subgingival bacterial flora and sex hormones in saliva during pregnancy. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, Tokyo, v. 35, n. 3, p. 139-151, Aug. 1994.

NEWMAN, M. G. Current concepts of the pathogenesis of periodontal disease. Microbiology emphasis. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 56, n. 12, p. 734-739, Dec. 1985.

NORSKOV-LAURITSEN, N.; KILIAN, M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb.

nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Reading, v. 56, n. 9, p. 2135-2146, Sep. 2006.

OFFENBACHER, S. et al. Maternal periodontitis and prematurity. Part I: Obstetric outcome of prematurity and growth restriction. **Annals of periodontology**, Chicago, v. 6, n. 1, p. 164-174, Dec. 2001.

OFFENBACHER, S. et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 67, n. 10 Suppl, p. 1103-1113, Oct. 1996.

OFFENBACHER, S. et al. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications **Annals of periodontology**, Chicago, v. 3, n. 1, p. 233-250, Jul. 1998.

OFFENBACHER, S. Periodontal diseases: pathogenesis. **Annals of periodontology**, Chicago, v. 1, n. 1, p. 821-878, Nov. 1996.

OLIVEIRA, A. S. **Cárie dentária e doença periodontal em gestantes: um estudo de prevalência em usuárias do serviço público de Juiz de Fora – MG.** 2009. 144f. Dissertação (Mestrado).– Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

PAGE, R. C. et al. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 14, n. 1, p. 216-248, Jun. 1997.

PEARCE, M. A. et al. Genetic heterogeneity in *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella corporis* and related species isolated from oral and nonoral sites. **Oral microbiology and immunology**, Copenhagen, v. 15, n. 2, p. 89-95, Apr. 2000.

PERNTHALER, A.; PERNTHALER, J.; AMANN, R. Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 68, n. 6, p. 3094-3101, Jun. 2002.

PERNTHALER, J. et al. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Methods in microbiology**, St Petersburg, v. 30, p. 207-226, 2001.

PRIEDOLS, K. F. M. **Doença periodontal em puérperas com parto prematuro.** 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Ginecologia e Obstetrícia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

RABER-DURLACHER, J. E. et al. Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: clinical, endocrinological, and microbiological aspects. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 21, n. 8, p. 549-558, Sep. 1994.

RAMOS, T. M. et al. Condições bucais e hábitos de higiene oral em gestantes de baixo nível sócio-econômico no município de Aracajú – SE. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v. 6, n. 3, p. 229-235, set./dez. 2006.

RAMS, T. E.; FEIK, D.; SLOTS, J. *Campylobacter rectus* in human periodontitis. **Oral microbiology and immunology**, Copenhagen, v. 8, n. 4, p. 230-235, Aug. 1993.

RIEP, B. et al. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 47, n. 6, p. 1705-1711, Jun. 2009.

RIVIERE, G. R. et al. Relative proportions of pathogen-related oral spirochetes (PROS) and *Treponema denticola* in supragingival and subgingival plaque from patients with periodontitis. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 63, n. 2, p. 131-136, Feb. 1992.

ROSA, O. P. et al. Periodontopathogens in the saliva and subgingival dental plaque of a group of mothers. **Pesquisa odontológica brasileira**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 313-318, Oct./Dec. 2002.

ROSELL, F. L.; MONTANDON-POMPEU, A. A. B.; VALSECKI JÚNIOR, A. Registro periodontal simplificado em gestantes. **Revista de saúde pública**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 157-162, mar./abr. 1999.

RUDNEY, J. D.; CHEN, R.; SEDGEWICK, G. J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. **Journal of dental research**, Chicago, v. 84, n. 1, p. 59-63, Jan. 2005.

RUDNEY, J. D.; CHEN, R.; SEDGEWICK, G. J. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. **Infection and immunity**, Washington, v. 69, n. 4, p. 2700-2707, Apr. 2001.

RYLEV, M.; KILIAN, M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 35, n. 8 Suppl, p. 346-361, Sep. 2008.

SAKAMOTO, M. et al. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Reading, v. 52, n. 3, p. 841-849, May. 2002.

SAKAMOTO, M.; UMEDA, M.; BENNO, Y. Molecular analysis of human oral microbiota. **Journal of periodontal research**, Copenhagen, v. 40, n. 3, p. 277-285, Jun. 2005.

SANZ, M. et al. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology,

with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 31, n. 12, p. 1034-1047, Dec. 2004.

SAYGUN, I. et al. Salivary infectious agents and periodontal disease status. **Journal of periodontal research**, Copenhagen, v. 46, p. 235-239, 2011.

SHAH, H. N.; GHARBIA, S. E. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. **International journal of systematic bacteriology**, Ames, v. 42, n. 4, p. 542-546, Oct. 1992.

SHARMA, A. et al. Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation. **Oral microbiology and immunology**, Copenhagen, v. 20, n. 1, p. 39-42, Feb. 2005.

SILK, H. et al. Oral health during pregnancy. **Am Fam Physician**. v. 77, p. 1139-1144, 2008.

SKULDBOL, T. et al. Is pre-term labour associated with periodontitis in a Danish maternity ward? **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 33, n. 3, p. 177-183, Mar. 2006.

SLOTS, J.; SLOTS, H. Bacterial and viral pathogens in saliva: disease relationship and infectious risk. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 55, p. 48-69, 2011.

SLOTS, J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 13, n. 10, p. 912-917, Nov. 1986a.

SLOTS, J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. **Oral microbiology and immunology**, Copenhagen, v. 1, n. 1, p. 48-57, Nov. 1986b.

SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 25, n. 2, p. 134-144, Feb. 1998.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 5, n. 1, p. 7-25, Jun. 1994.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Microbiologia da doença periodontal. In: LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 1048 p.

SUNDE, P. T. et al. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. **Microbiology**, Reading, v. 149, n. 5, p. 1095-1102, May. 2003.

TAANI, D. Q., et al. The periodontal status of pregnant women and its relationship with socio-demographic and clinical variables. **J Oral Rehabil**, v. 30, p. 440-445, 2003.

- TANNER, A. C.; IZARD, J. *Tannerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 42, n. 1, p. 88-113, Oct. 2006.
- THURNHEER, T.; GMÜR, R.; GUGGENHEIM, B. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 37-47, Jan. 2004.
- Tilakaratne, A. et al. Periodontal disease status during pregnancy and 3 months post-partum, in a rural population of Sri-Lankan women. . **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 27, p. 787-792, 2000.
- Umeda M, Contreras A, Chen C, Bakker I, Slots J. The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. **Journal of periodontology**, Chicago, v. 69, p. 828-833, 1998.
- ÚRBAN, E. et al. Distribution of anaerobic bacteria among pregnant periodontitis patients who experience preterm delivery. **Anaerobe**, London, v. 12, n. 1, p. 52-57, Feb. 2006.
- VETTORE, M. V. et al. The relationship between periodontal disease and preterm low birthweight: clinical and microbiological results. **Journal of periodontal research**, Copenhagen, v. 43, n. 6, p. 615-626, Aug. 2008.
- XIONG, X. et al. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: a systematic review. **BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology**, Oxford, v. 113, n. 2, p. 135-143, Feb. 2006.
- YANO-HIGUCHI, K. et al. Prevalence of *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival microflora of Japanese patients with adult and rapidly progressive periodontitis. **Journal of clinical periodontology**, Copenhagen, v. 27, n. 8, p. 597-602, Aug. 2000.
- YOKOYAMA, M. et al. Effect of female sex hormones on *Campylobacter rectus* and human gingival fibroblasts. **Oral microbiology and immunology**, Copenhagen, v. 20, n. 4, p. 239-243, Aug. 2005.
- YOKOYAMA, M. et al. Relationship between *Campylobacter rectus* and periodontal status during pregnancy. **Oral microbiology and immunology**, Copenhagen, v. 23, n. 1, p. 55-59, Feb. 2008.

| APÊNDICES | |
|-------------------|---|
| APÊNDICE A | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| APÊNDICE B | Roteiro de Entrevista |
| APÊNDICE C | Resultados preliminares do estudo piloto |
| APÊNDICE D | Resumo do trabalho apresentado sob a forma de pôster na 28ª reunião anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO) em Águas de Lindóia 2011 |
| APÊNDICE E | Resumo do trabalho apresentado sob a forma de pôster na <i>International Association for Dental Research (IADR) - 90th General Session & Exhibition of the IADR Iguaçu Falls, Brazil – June 20-23, 2012</i> |

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é da pesquisadora responsável. Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o CEP – Comitê de Ética em Pesquisa pelo telefone 3229-3788.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

1. Pesquisadora responsável

- Fernanda Campos Machado - Odontopediatra, Doutoranda em Saúde Brasileira pela Universidade Federal de Juiz de Fora - MG.
- Contatos: (32) 3216-2454 ou (32) 9199-9617.

2. Pesquisadora participante

- Profa. Dra. Rosangela Almeida Ribeiro, professora titular da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora - MG.
- Contatos: (32) 3213-5714 ou (32) 9987-7093.

3. Título preliminar do estudo: “Parâmetros periodontais clínicos e microbiológicos de mulheres na gestação e no pós-parto”.

4. Objetivo: Esta pesquisa tem como objetivo verificar as condições de saúde bucal de mulheres durante a gestação e no pós-parto atendidas no serviço público de Juiz de Fora - MG. Se você resolver participar, você deverá responder a uma entrevista que será realizada pela pesquisadora responsável e submeter-se a um exame clínico de rotina e a uma coleta de placa bacteriana dos seus dentes.

5. Benefício: Como benefício indireto por participar deste estudo, você contribuirá para o levantamento de aspectos importantes para a saúde materno-infantil e para o

desenvolvimento de programas de educação e/ou atenção odontológica às gestantes com o objetivo de preservar a saúde materna e a saúde do bebê.

6. Risco: Os únicos riscos previstos para você, como participante desta pesquisa, é a possibilidade eventual de você se sentir constrangida, pessoalmente, frente às questões do formulário ou sentir algum desconforto durante a realização do exame clínico ou da coleta de placa bacteriana. Todavia garanto que você não será identificada por meio do formulário preenchido. Adicionalmente, você tem a garantia de que receberá respostas às suas perguntas e esclarecimentos das dúvidas sobre o estudo sempre que preciso.

7. Penalidade: Nenhuma penalidade lhe será imposta caso você não queira participar ou desista, em qualquer momento, de continuar contribuindo no estudo.

8. Ressarcimento: Como este estudo não implica em gastos financeiros para você, sujeito participante, não está prevista nenhuma forma de ressarcimento.

8. Consentimento livre e esclarecido:

Eu, _____, RG/CPF nº _____, certifico que, tendo lido as informações prévias e tendo sido suficientemente esclarecida pela Pesquisadora Responsável sobre todos estes itens, estou de acordo com a realização do estudo, concordando com a minha participação como voluntária

Juiz de Fora, _____ de _____ de 20__.

Assinatura da voluntária



Assinatura Dactiloscópica

Fernanda Campos Machado

Pesquisadora responsável (C.I. M-8632164 SSPMG)

APÊNDICE B

Gestante

Não Gestante

Nº:

DATA DO EXAME INICIAL: ___/___/___ TEMPO DE GESTAÇÃO: _____

NOME: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: _____

DUM: ___/___/___ DPP: ___/___/___

DATA DO EXAME 48H APÓS O PARTO: ___/___/___

PESO DO BEBÊ AO NASCER: _____ ALTURA DO BEBÊ AO NASCER: _____

NASCEU COM QUANTAS SEMANAS DE GESTAÇÃO? _____

OBS: _____

DATA DO EXAME 2 MESES APÓS O PARTO: ___/___/___

ESTÁ AMAMENTADO NO EXAME DE 2 MESES: () SIM () NÃO

OBS: _____

1 DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS

1.1 Idade: _____ anos

1.2 Cor da pele: () branca () negra () mulata

1.3 Estado Civil: () solteira () casada () união estável () outro: _____

1.4 Escolaridade: (segundo ABEP)

() Analfabeto ou primário incompleto

() Primário completo (quarta série do primeiro grau completa)

() Ginásio completo (primeiro grau completo)

() Colegial completo (segundo grau completo)

() Superior completo Em que? _____

1.6 Grau de Instrução do chefe de família: (segundo ABEP)

() Analfabeto ou primário incompleto

() Primário completo (quarta série do primeiro grau completa)

() Ginásio completo (primeiro grau completo)

() Colegial completo (segundo grau completo)

() Superior completo

1.7 Dos itens abaixo, qual(s) você possui? (segundo ABEP)

() Televisor em cores () 0 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5 () 6 +

() Rádio () 0 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5 () 6 +

() Banheiro () 0 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5 () 6 +

() Automóvel () 0 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5 () 6 +

() Empregada () 0 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5 () 6 +

1.8 Dos eletrodomésticos abaixo, qual(s) você possui? (segundo ABEP)

Aspirador de pó () sim () não
 Máquina de lavar roupa () sim () não
 Videocassete () sim () não
 Geladeira () sim () não

2 INVENTÁRIO DE SAÚDE

2.1 É seu primeiro filho? () sim () não

2.2 Quantos filhos tem? _____

2.3 Já teve algum bebê prematuro? () sim () não

2.4 Já teve algum bebê de baixo peso? () sim () não

2.5 Já teve algum parto complicado? () sim () não

2.6 Perdeu algum bebê? () sim () não

2.7 Esta gestação está sendo acompanhada pelo médico? () sim () não

2.8 Quantos exames pré-natais você já fez? _____

2.9 Teve algum problema de saúde durante a gestação? () sim () não **Qual?** _____

2.10 Tem ou já teve algum problema de saúde?

() **Hipertensão.** Desde quando? _____

() **Diabetes.** Que tipo? _____

() **Anemia.** Qual? _____ Quando? _____

() **Infecção urinária.** Quando? _____

() **Doença sexualmente transmissível.** Qual? _____ Quando? _____

2.11 Tomou ou toma algum medicamento? () sim () não **Qual:**

() **Antibiótico.** Qual? _____ Há quanto tempo? _____

() **Antiinflamatório.** Qual? _____ Há quanto tempo? _____

() **Antifúngico.** Qual? _____ Há quanto tempo? _____

() **Analgésicos.** Qual? _____ Há quanto tempo? _____

() **Hormônios.** Qual? _____ Há quanto tempo? _____

() **Anticonvulsivante.** Qual? _____ Há quanto tempo? _____

() **Ansiolítico.** Qual? _____ Há quanto tempo? _____

() **Outro.** Qual? _____ Há quanto tempo? _____

2.12 Fuma? () sim () não **Quantos cigarros por dia?** _____ **Desde quando?** _____

2.13 Se parou de fumar, foi há quanto tempo? _____

2.14 Parou de fumar durante a gestação? () sim () não **Quando?** _____

2.15 Bebe? () sim () não **Quantas vezes por semana?** _____

2.16 Parou de beber durante a gestação? () sim () não **Quando?** _____

2.17 Fez uso de outra droga no período gestacional? () sim () não **Qual?** _____

2.18 Teve muitas náuseas na gestação? () sim () não

2.19 Faz acompanhamento odontológico na gestação? () sim () não

Por quê? _____

2.20 Realiza algum tipo de tratamento odontológico? () sim () não

Qual? _____

2.21 Qual foi a última vez que foi ao dentista? _____

Para que? _____

2.22 Durante a gestação seu apetite aumentou? () sim () não

2.23 Quantas refeições principais faz por dia? _____ **E quantas nos intervalos?** _____

2.24 Quantas vezes escova os dentes por dia durante este período? _____

2.25 Usa o fio dental? () sim () não

2.26 Percebeu alguma alteração nos dentes/gengivas na gestação? () sim () não

Qual? _____

2.27 Já perdeu algum dente? () sim () não **Quantos?** _____

Porque? _____

2.28 Sua gengiva sangra na hora da higiene bucal? () sim () não

EXAME CLÍNICO 2 MESES PÓS PARTO:

| CONDIÇÃO PERIODONTAL | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|------------------|----|----|----|-------------------------|----|----|----|----|----|-------------------|----|----|----|
| Região | Superior direita | | | | Bateria labial superior | | | | | | Superior esquerda | | | |
| Elemento | 17 | 16 | 15 | 14 | 13 | 12 | 11 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 |
| SS | | | | | | | | | | | | | | |
| PC | | | | | | | | | | | | | | |
| PS | | | | | | | | | | | | | | |
| NCI | | | | | | | | | | | | | | |
| Região | Inferior direita | | | | Bateria labial inferior | | | | | | Inferior esquerda | | | |
| Elemento | 37 | 36 | 35 | 34 | 33 | 32 | 31 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 |
| SS | | | | | | | | | | | | | | |
| PC | | | | | | | | | | | | | | |
| PS | | | | | | | | | | | | | | |
| NCI | | | | | | | | | | | | | | |

APÊNDICE C

RESULTADOS DO ESTUDO PILOTO

Neste capítulo, serão apresentados os resultados relativos à padronização da técnica, obtidos a partir do estudo piloto.

Teste de pesagem da amostra

Após pesagem de oito tubos de microcentrífuga, para cada grupo, antes e após a coleta, foram observados os seguintes resultados:

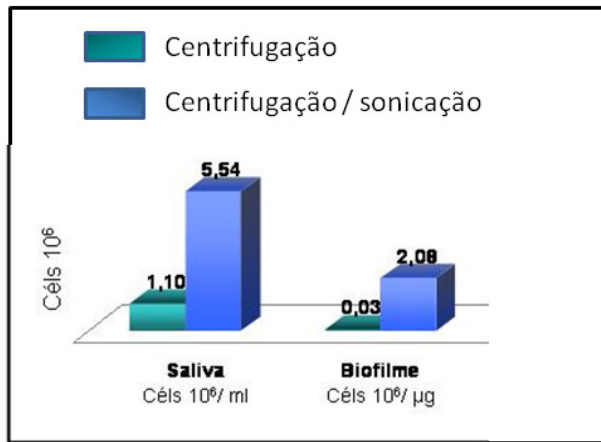
- Os tubos de microcentrífuga do grupo 1 – pesados com paraformaldeído – apresentaram redução de peso (média=-0,0125g) após a coleta de biofilme subgengival, provavelmente pela ocorrência de evaporação do paraformaldeído.
- Em relação à coleta de biofilme subgengival realizada em tubo de microcentrífuga sem paraformaldeído foi observada uma diferença maior (média=0,0133g) de peso mensurável pela balança de precisão antes e após a coleta.

Assim, foi adotada a pesagem dos tubos de microcentrífuga sem paraformaldeído antes e após a coleta de biofilme subgengival e posterior adição de paraformaldeído a 2%.

Teste de centrifugação e centrifugação/sonicação da amostra

O tratamento 2 (centrifugação/sonicação) apresentou maior densidade bacteriana em todas as amostras – saliva e biofilme (Gráfico 1).

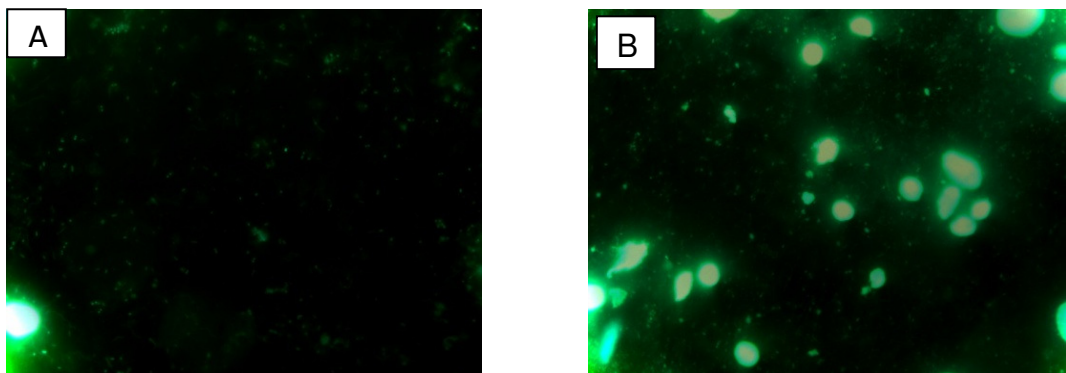
Gráfico 1 – Densidade bacteriana obtida a partir dos tratamentos aplicados (centrifugado ou centrifugado/sonicado), para as amostras de saliva, biofilme e fluido de sulco gengival.



Fonte: O autor.

Para as amostras de saliva (Fotografia 1), foi encontrada uma média de $1,10 \times 10^6$ céls/ml no tratamento 1 (centrifugação) e de $5,54 \times 10^6$ céls/ml no tratamento 2, sendo que a diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($P=0,161$).

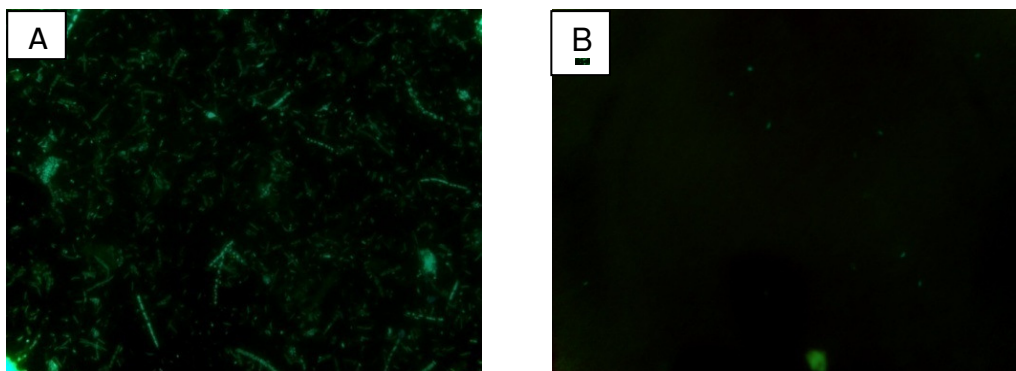
Fotografia 1 – Imagens de microscopia de epifluorescência de amostra de saliva corada com DAPI, após tratamento por centrifugação (A) e centrifugação/sonicação (B).



Fonte: O autor.

Para as amostras de biofilme subgengival (Fotografia 2), foi observada uma média de densidade bacteriana aproximadamente 70 vezes maior para o tratamento 2, em comparação com o tratamento 1 ($P=0,012$), demonstrando maior capacidade do ultrassom em romper a forte aderência entre os micro-organismos desta estrutura.

Fotografia 2 – Imagens de microscopia de epifluorescência de amostra de biofilme subgingival corada com DAPI, após tratamento por centrifugação (A) e centrifugação/sonicação (B).



Fonte: O autor.

Assim, a combinação de tratamento da amostra por centrifugação e sonicação mostrou ser a técnica mais adequada para a extração de bactérias orais, uma vez que propiciou a observação de maior densidade bacteriana.

APÊNDICE D

Nº Inscrição: Nº Trabalho: 2369

Nome: Fernanda Campos Machado Categoria: Sócio Aspirante

Área Relacionada: 3 - Controle de infecção / Microbiologia / Imunologia Modalidade: Painel Aspirante

Descritores: Gestantes, Placa Dentária, Hibridização In Situ Fluorescente

Avaliação da microbiota periodontal de gestantes e não gestantes pela técnica da hibridização *in situ* fluorescente

Machado FC*, Assis AVDA, Antunes FC, Alves RT, Cesar DE, Ribeiro RA

- Faculdade De Odontologia - UFJF. Tel.: 3216-2454. E-mail: fercampo@terra.com.br

Níveis mais elevados de estrógeno e progesterona podem contribuir para maior suscetibilidade ao aparecimento de determinados micro-organismos periodontopatogênicos e consequente desenvolvimento da doença periodontal em gestantes. Este estudo transversal avaliou parâmetros periodontais clínicos e microbiológicos de gestantes e não gestantes com o objetivo de verificar a diferença entre os grupos. Foram incluídas 17 gestantes (grupo caso) e 15 não gestantes (grupo controle) pareadas por idade, raça e nível socioeconômico. Foi realizada coleta de biofilme subgingival para a quantificação bacteriana total e de oito periodontopatógenos pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). O exame clínico determinou a condição periodontal das mulheres por meio dos indicadores: profundidade de sondagem, presença de cálculo, perda de inserção periodontal e sangramento à sondagem. O teste *Mann-Whitney* foi utilizado para comparação entre os grupos e o teste de correlação de *Spearman* identificou a correlação entre os parâmetros periodontais clínicos e microbiológicos. O nível de significância adotado foi de 5%. Não foi demonstrada diferença entre os grupos em relação à contagem bacteriana total ($P=0,117$). Não houve diferença quanto à contagem dos periodontopatógenos analisados ($P>0,05$). Não foi identificada nenhuma correlação entre os indicadores periodontais clínicos e a contagem de periodontopatógenos ($P>0,05$).

Este estudo rejeitou a hipótese de diferença qualitativa e quantitativa de periodontopatógenos entre gestantes e não gestantes.

APÊNDICE E

International Association for Dental Research (IADR) - 90th General Session & Exhibition of the IADR Iguaçu Falls, Brazil – June 20-23, 2012.

Presentation Mode: Poster Session
 Presentation Date: Friday, June 22, 2012
 Session Title: Clinical Oral Microbiology
 Session Time: 2:15 PM - 3:30 PM

2491 PERIODONTAL PATHOGENS COUNTS IN SALIVA OF PREGNANT AND NON-PREGNANT WOMEN

F. MACHADO, F.C. ANTUNES, C. CARRADA, F.R. SCALIONI, C.G. DINIZ, D.E. CESAR, and R.A. RIBEIRO.

Universidade Federal De Juiz De Fora, Juiz de Fora, Brazil.

Abstract

Objective: The aim of this study was to identify, enumerate and compare eight periodontopathogens in saliva of pregnant and non-pregnant women using the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique.

Method: This cross-sectional study included 20 consecutive pregnant women (Pr group) in their second trimester of pregnancy and 20 consecutive non-pregnant women (N-Pr group). All subjects were aged between 24 and 32 years old, had good general health and a minimum of 20 permanent teeth. Information about marital status, schooling and economic class were collected. Probing depth, bleeding on probing, clinical attachment loss and presence of calculus were recorded. Unstimulated whole saliva was collected from each subject. The FISH technique identified the presence and number of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* in the saliva samples. The Mann–Whitney test was applied to compare the data between the two groups.

Result: No significant differences were observed between the Pr and N-Pr groups, considering age, ethnicity, marital status, schooling and economic class. Among Pr and N-Pr group, 14 and 16 women had no periodontal disease, respectively ($p=0.256$). There were no significant differences between Pr and N-Pr groups for the number of teeth, clinical parameters and the mean total bacterial count. Significantly higher number and percentage of *P. intermedia* ($p<0.001$) e *P. nigrescens* ($p<0.05$) were found in the saliva of the pregnant women.

Conclusion: The higher counts of *P. Intermedia* and *P. nigrescens* in the saliva of pregnant women may contribute to periodontal disease progression during pregnancy.

| ANEXOS | |
|----------------|---|
| ANEXO A | Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa / UFJF |
| ANEXO B | Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa / UFJF |
| ANEXO C | Aceite para a publicação do artigo " <i>Determination and enumeration of periodontopathogenic bacteria in subgingival biofilm of pregnant women</i> " no periódico <i>Brazilian Oral Research</i> |

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36036900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

Parecer nº 262/2008

Protocolo CEP-UFJF: 1501.192.2008 **FR:** 204916 **CAAE:** 0166.0.180.180-08

Projeto de Pesquisa: Microbiota periodontal na gestação e no pós-parto de usuárias do Sistema Único de Saúde de Juiz de Fora – MG

Area Temática: GRUPO III

Pesquisador Responsável: Fernanda Campos Machado

Pesquisadores Participantes: Cláudio Gallupo Diniz; Rosângela Almeida Ribeiro

Instituição: Hospital Maternidade Terezinha de Jesus – Juiz de Fora - MG

Sumário/comentários do protocolo:

- Justificativa: A doença periodontal (DP) é uma das doenças infecciosas mais comuns da humanidade. Na ausência de higiene bucal adequada, as bactérias periodontais acumulam-se no sulco gengival dos dentes e formam uma estrutura organizada conhecida como biofilme bacteriano. Embora a etiologia básica da doença periodontal seja a infecção pelo biofilme bacteriano, em algumas condições, como a gestação, outros fatores podem modificar a resposta periodontal às alterações microbianas. Maior susceptibilidade da inflamação periodontal durante a gestação se deve às alterações nos níveis dos hormônios sexuais próprias deste período. Além disso, as bactérias e/ou seus fatores de virulência podem entrar na corrente sanguínea, disseminar-se pelo corpo e induzir respostas inflamatórias sistêmicas e/ou infecções ectópicas. A capacidade de periodontopatógenos e seus fatores de virulência disseminarem-se e induzirem respostas inflamatórias locais e sistêmicas levantou a hipótese de que a DP pode ter consequências além dos tecidos periodontais, sugerindo a associação desta doença com um maior risco de intercorrências sistêmicas, como os resultados adversos da gestação – nascimento prematuro, de baixo peso, pré-eclâmpsia e aborto. Além disso, dados obtidos sugeriram que a ameaça da infecção materna por patógenos periodontais pode não estar limitada à duração da gestação, mas pode também afetar o crescimento e desenvolvimento neurológico perinatal.
- Objetivo: Determinar a prevalência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gengivais*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* e *Tannerella forsythensis* em um grupo de mulheres durante a gestação e o pós-parto, usuárias do Sistema Único de Saúde de Juiz de Fora – MG.
- Metodologia: As mulheres serão avaliadas em três momentos: no segundo trimestre da gestação (da 12ª semana à 24ª semana), até 48h após o parto, e 30 dias após o parto; para as gestantes selecionadas para o estudo, será preenchido um prontuário (Apêndice 2), que incluirá dados sociodemográficos e inventário de saúde. Posteriormente, as pacientes serão submetidas ao exame clínico e coleta de espécime clínico.
- Revisão e referências bibliográficas sustentam os objetivos do estudo.
- Características da população a estudar: A população do estudo será composta por 50 mulheres atendidas pelo Programa de Pré-Natal do Hospital Maternidade Terezinha de Jesus em Juiz de Fora, Minas Gerais
- Orçamento detalhado está presente.
- Instrumentos de coleta de dados estão de acordo com os objetivos estabelecidos
- Cronograma está em presente – Período 08/2008 a 07/2010.
- Identificação dos riscos e desconfortos possíveis está presente assim como a identificação de benefícios esperados.
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, está em linguagem adequada, clara para compreensão do sujeito. Está presente a explicitação de riscos e desconfortos esperados, ressarcimento de despesas e indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.
- Qualificação do pesquisador é compatível com o projeto de pesquisa.
- Salientamos que o pesquisador deverá encaminhar a este comitê o relatório final da pesquisa.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Situação: Projeto Aprovado
Juiz de Fora, 28 de agosto de 2008

Cyntia
Profa. Ms. Cyntia Páze Schmitz Correa
Coordenadora – CEP/UFJF

| |
|--------------------|
| RECEBI |
| DATA: ___/___/2008 |
| ASS: _____ |

ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36036900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

Parecer nº 130/2010

Protocolo CEP-UFJF: 2059.118.2010 **FR:** 334971 **CAAE:** 0084.0.180.000-0

Projeto de Pesquisa: Influência da gestação na microbiota periodontal.

Versão do Protocolo e Data: Primeira versão.

Area Temática: Grupo III.

Pesquisador Responsável: Rosângela Almeida Ribeiro.

TCLE: Primeira versão.

Pesquisadores Participantes: Fernanda Campos Machado, Dionéia Evangelista Cesar e Renata Tolêdo Alves.

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Sumário/comentários do protocolo:

- Justificativa(s): Trata-se de temática relevante sobre o estudo da doença periodontal durante o período gestacional. Considerando que a gestação pode modificar a microbiota periodontal e, que os periodontopatógenos podem estimular a progressão da doença periodontal e contribuir para desfechos adversos da gestação, caracterizar o perfil periodontal microbiológico de gestantes e não gestantes poderá contribuir na identificação de grupos de risco e repercutir na saúde materno-infantil.
- Objetivo: Quantificar e qualificar os periodontopatógenos presentes na microbiota bucal de mulheres no segundo trimestre da gestação. Esse objetivo está sustentado pela justificativa.
- Metodologia: Serão avaliadas 20 mulheres no segundo trimestre de gestação, encaminhadas pelo SUS, com idade entre 24 e 36 anos. Adicionalmente, serão avaliadas 20 mulheres não gestantes, pareadas por idade, etnia e nível sócio econômico, para grupo controle. Para caracterização clínica a doença periodontal, serão os seguintes indicadores: Índice Periodontal Comunitário, Sangramento à Sondagem e Perda da Inserção Periodontal. A identificação e quantificação de espécies bacterianas presentes na saliva, no biofilme e fluido de sulco gengival será obtida pela técnica de diagnóstico molecular de hibridização in situ fluorescente. Toda essa metodologia está coerente com o objetivo proposto.
- Revisão e referências: As referências apresentadas sustentam a realização do estudo.
- Orçamento: Está adequado para o desenvolvimento da pesquisa. E, todos os gastos financeiros serão custeados pela pesquisadora responsável.
- Cronograma: Está adequado para o desenvolvimento da pesquisa. E, será desenvolvido entre o período de 06/2010 a 06/2011.
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE: Está em linguagem adequada, clara para compreensão do sujeito, descreve os procedimentos, explicita os riscos e desconfortos esperados, informa a possibilidade de ressarcimento de despesas, indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa e está de acordo com a Res. 196/96 CNS.
- Qualificação da pesquisadora: A pesquisadora Doutora apresenta experiência para o pleno desenvolvimento da pesquisa.
- Salientamos que o pesquisador deverá encaminhar a este comitê o relatório final da pesquisa. Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.
Juiz de Fora, 20 de maio de 2010

Rosângela Almeida Ribeiro
Prof. Dra. Iêda Maria Ávila Vargas Dias
Coordenadora – CEP/UFJF

| |
|----------------------|
| RECEBI |
| DATA: ____/____/2010 |
| ASS: _____ |

ANEXO C



Brazilian
Oral Research

São Paulo, June 20, 2012.

To the authors:

Fernanda Campos Machado,
Dionéia Evangelista Cesar,
Amanda Vervloet Dutra Agostinho Assis,
Cláudio Galuppo Diniz,
Rosângela Almeida Ribeiro

We are pleased to inform you that your article, titled *"Detection and enumeration of periodontopathogenic bacteria in subgingival biofilm of pregnant women"* received under protocol number 934, has been **APPROVED** for publication.

We would like to take this opportunity to inform you that we may get in touch with you again before the article is published.

May we congratulate the team and thank you for your contribution to our journal and to our endeavor of achieving scientific excellence, thus becoming more widely recognized in world dental research.

Sincerely yours,

BOR Publishing Commission

Brazilian Oral Research
Av. Botafogo, 110 - Botafogo, 2225-010
Rio de Janeiro, RJ
Brasil - CEP: 22250-110
CNPJ nº 07.000.000
Tel: +55 21 2509-0810
e-mail: bor@scielo.br
www.scielo.br/bor

Consult *Brazilian Oral Research* at the SciELO site.
<http://www.scielo.br/revistas/bor>

PublFondo@fmodi.edu



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

FERNANDA CAMPOS MACHADO

**PARÂMETROS PERIODONTAIS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS DE
MULHERES NA GESTAÇÃO E NO PÓS-PARTO**

Juiz de Fora

2012

Machado, Fernanda Campos.

Parâmetros periodontais clínicos e microbiológicos de mulheres na
gestação e no pós-parto / Fernanda Campos Machado. – 2012.
124 f. : il.

Tese (Doutorado em Saúde)–Universidade Federal de Juiz de Fora,
Juiz de Fora, 2012.

1. Gravidez. 2. Saúde bucal. 3. Microbiologia. I. Título.

CDU 618.2