

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-Graduação em Saúde

Cristiane Corsini Medeiros Otenio

DOENÇA PERIODONTAL EM GESTANTES – EXPRESSÃO GÊNICA DE  
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ÓXIDO NÍTRICO

JUIZ DE FORA  
2012

Otenio, Cristiane Corsini Medeiros.

Doença periodontal em gestantes : expressão gênica de citocinas inflamatórias e óxido nítrico / Cristiane Corsini Medeiros Otenio. – 2012. 101 f. : il.

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

1. Citocinas. 2. Gengiva. 3. Periodontite. I. Título.

CDU 577.1

CRISTIANE CORSINI MEDEIROS OTENIO

**DOENÇA PERIODONTAL EM GESTANTES – EXPRESSÃO GÊNICA DE  
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ÓXIDO NÍTRICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado 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 Grau de Doutor em Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosangela Almeida Ribeiro

Co-orientadoras: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Ferreira  
Dr<sup>ª</sup>. Marta Fonseca Martins

JUIZ DE FORA  
2012

CRISTIANE CORSINI MEDEIROS OTENIO

Doença periodontal em gestantes – expressão gênica de citocinas  
inflamatórias e óxido nítrico

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado 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 Grau de Doutor em Saúde.

Aprovado em 24/08/2012

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosangela Almeida Ribeiro  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Angela Maria Gollner  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Neuza Maria Souza Picorelli Assis  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Miori Pascon  
Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Odontologia de Piracicaba

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Milene Zanoni da Silva Vosgerau  
Universidade Federal do Paraná

JUIZ DE FORA  
2012

## DEDICATÓRIA

*Ao meu esposo Marcelo, por seu amor,  
pelo companheirismo e pelo grande  
incentivo.*

*Aos meus pais, Maria de Lourdes e  
Rubens, pelo amor, dedicação e exemplos  
de honestidade, dignidade, humildade e  
luta.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, pela força, proteção e aconchego em todos os momentos em minha vida.*

*À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosangela Almeida Ribeiro, por ter me conduzido com serenidade e confiança, pelo apoio e incentivo recebido que foram essenciais na execução deste trabalho, minha eterna gratidão.*

*À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Neuza Maria Souza Picorelli Assis, pelos ensinamentos e pela incansável ajuda no desenvolvimento deste estudo, meus sinceros agradecimentos.*

*À Dr<sup>ª</sup>. Marta Fonseca Martins, minha co-orientadora, pela oportunidade da vivência prática em Biologia Molecular, meu muito obrigado.*

*À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Ferreira, pela disponibilidade em co-orientar o estudo, meus sinceros agradecimentos.*

*Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Ribeiro, pelas valiosas contribuições no desenvolvimento deste estudo.*

*À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Glória Fernanda Barbosa de Araújo Castro, pelas contribuições no exame de Qualificação.*

*À Isabela Fonseca, pelo carinho, amizade e ensinamentos compartilhados que foram imprescindíveis na execução deste trabalho.*

*À Isabella Silvestre Barreto Pinto, pela ajuda em todos os momentos e pela amizade.*

*À Embrapa Gado de Leite, pela autorização para realização deste trabalho, na disponibilização dos equipamentos e laboratórios.*

*Aos profissionais de saúde do serviço público municipal, pelo apoio e colaboração.*

*Às mulheres voluntárias, pelo carinho, confiança e disponibilidade com que colaboraram na realização desta pesquisa.*

*Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Saúde, pelos conhecimentos compartilhados.*

*Aos funcionários do Departamento de Pós-Graduação em Saúde, pela dedicação e competência com que fazem seu trabalho.*

*À CAPES, pela bolsa de Doutorado.*

*“Feliz aquele que transfere o que sabe  
e aprende o que ensina.”  
(Cora Coralina)*



## RESUMO

A doença periodontal é uma das mais prevalentes doenças bucais. Uma associação entre esta doença e a gravidez é sugerida, mas os resultados disponíveis são controversos. O objetivo deste estudo foi identificar e avaliar o nível de expressão de interleucinas (*IL-1 $\beta$*  e *IL-6*), fator de necrose tumoral-alfa (*TNF- $\alpha$* ), e óxido nítrico sintase induzível (*iNOS*) em gestantes com e sem doença periodontal, em comparação com não gestantes com e sem doença periodontal. As mulheres da amostra foram distribuídas em quatro grupos: gestantes com doença periodontal (GD), gestantes sem doença periodontal (GND), não gestantes com doença periodontal (NGD) e não gestantes sem doença periodontal (NGND). A condição periodontal foi avaliada de acordo com a profundidade de sondagem, nível de inserção clínico e sangramento à sondagem. A análise da expressão dos genes foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Foram realizadas comparações do nível de expressão gênica entre os quatro grupos. A expressão de *IL-1 $\beta$*  no grupo NGD foi 12,6 vezes maior que no grupo NGND ( $p < 0,01$ ), enquanto que a expressão de *TNF- $\alpha$*  no grupo NGND foi 3,5 vezes maior que no grupo NGD ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença nos níveis de expressão dos genes *IL-1*, *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  e *iNOS* em gestantes, com e sem doença periodontal em comparação com a expressão do mesmos genes em não gestantes, com e sem doença periodontal. Os resultados obtidos sugerem que a doença periodontal não é influenciada pela gravidez.

Palavras-chave: Citocinas. Gengiva. Periodontite. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

## ABSTRACT

Periodontal disease is one of the most prevalent oral diseases. An association between this disease and pregnancy is suggested, but the available findings are controversial. The objective of this study was to identify and evaluate the expression level of the interleukins (*IL-1 $\beta$*  and *IL-6*), tumor necrosis factor-alpha (*TNF- $\alpha$* ), and inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) in pregnant women with and without periodontal disease in comparison with non-pregnant women with and without periodontal disease. The women in the sample were distributed into four groups: pregnant women with periodontal disease (PrD), pregnant women without periodontal disease (PrND), non-pregnant women with periodontal disease (N-PrD) and non-pregnant women without periodontal disease (N-PrND). The periodontal condition was evaluated according to the probing depth, clinical attachment level and bleeding on probing. The analysis of the genes' expression was performed by real-time Polymerase Chain Reaction. Comparisons were made of the level of gene expression among the four groups. The expression of *IL-1 $\beta$*  in the N-PrD group was 12.6 times that in the N-PrND group ( $p < 0.01$ ), while the expression of *TNF- $\alpha$*  in the N-PrND group was 3.5 times that in the N-PrD group ( $p < 0.05$ ). There were no differences in the expression levels of the genes *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  and *iNOS* in pregnant women with and without periodontal disease in comparison to the expression of the same genes in non-pregnant women with and without periodontal disease. The results suggest that periodontal disease is not influenced by pregnancy.

Keywords: Cytokines. Gingiva. Periodontitis. Real-time Polymerase Chain Reaction.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Código do registro do CPI e condição periodontal.	37
Quadro 2	Registro do índice de sangramento à sondagem.	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequências dos <i>primers</i> utilizados na PCR em Tempo Real.	41
Tabela 2	Concentração de <i>primer</i> e cDNA, eficiência da reação e temperatura de dissociação (TD) do fragmento amplificado para cada gene.	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEP	Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa
BBO	Bibliografia Brasileira de Odontologia
BIREME	Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde
Ca	Cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA	DNA complementar
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
COCHRANE	Revisões Sistemáticas da Colaboração Cochrane
CPI	Índice Periodontal Comunitário
CPITN	Índice Comunitário de Necessidade de Tratamento Periodontal
$C_t$	<i>Cycle threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença periodontal
E	Eficiência
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GCF	Fluido crevicular gengival
GD	Gestantes com doença periodontal
GMR	<i>Genetics and Molecular Research</i>
GND	Gestantes sem doença periodontal
$H_2O_2$	Peróxido de hidrogênio
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IPC	Índice Periodontal Comunitário
JAC	Junção amelocementária
LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
ME	Mercaptoetanol
MEDCARIBE	Literatura do Caribe em Ciências da Saúde

MEDLINE	MEDLARS on-line
MG	Minas Gerais
Mg	Magnésio
min	Minuto
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
n	Amostra
NGD	Não gestantes com doença periodontal
NIC	Nível de Inserção Clínico
NGND	Não gestantes sem doença periodontal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
N-PrD	<i>Non-pregnant women with periodontal disease</i>
N-PrND	<i>Non-pregnant women without periodontal disease</i>
P	Piloto
p	Probabilidade
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PG	Prostaglandina
PNNs	Polimorfonucleares
PrD	<i>Pregnant women with periodontal disease</i>
PrND	<i>Pregnant women without periodontal disease</i>
PUBMED	Base de dados da <i>U.S. National Library of Medicine and National Institutes of Health</i> – Estados Unidos
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
s	Segundos
SCIELO	<i>Scientific Electronic Library Online</i>
SS	Sangramento à sondagem
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TD	Temperatura de dissociação
Th	<i>T helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral

UFJF  
WHOLIS

Universidade Federal de Juiz de Fora  
*World Health Organization Library database*

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
©	<i>Copywrite</i>
$\Delta$	Delta
$\gamma$	Gama
g	Gramma
°C	Grau Celsius
=	Igual
®	Marca Registrada
<	Menor
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{L}$	Microlitro
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng	Nanogramma
nM	Nanomolar
n <sup>o</sup>	Número
%	Por cento
TM	<i>Trade Marke</i>
U	Unidade de atividade enzimática
M	Molar
$\geq$	Maior ou Igual



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
2.1 DOENÇA PERIODONTAL .....	19
2.2 DOENÇA PERIODONTAL E GESTAÇÃO .....	22
2.3 RESPOSTA IMUNE E DOENÇA PERIODONTAL .....	25
2.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL .....	29
<b>3 HIPÓTESE</b> .....	31
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	32
4.1 OBJETIVO GERAL .....	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	<b>33</b>
5.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO .....	33
5.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	34
5.3 ASPECTOS ÉTICOS .....	34
5.4 POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	34
<b>5.4.1 Critérios de inclusão</b> .....	35
<b>5.4.2 Critérios de exclusão</b> .....	35
5.5 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
<b>5.5.1 Instrumento da coleta de dados</b> .....	35
<b>5.5.2 Entrevista</b> .....	36
<b>5.5.3 Exame periodontal</b> .....	36
<b>5.5.4 Definição de doença periodontal</b> .....	38
<b>5.5.5 Coleta de tecido gengival</b> .....	38
<b>5.5.6 Análise laboratorial</b> .....	39
5.5.6.1 Extração de RNA total .....	39
5.5.6.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) .....	40
5.5.6.3 PCR em Tempo Real .....	41
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
<b>5.6.1 Análise descritiva</b> .....	42
<b>5.6.2 Análise dos dados de PCR em Tempo Real</b> .....	43
5.7 ESTUDO PILOTO .....	44

<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é a segunda patologia bucal mais prevalente no mundo e representa uma grande preocupação de saúde pública. É causada pela infecção dos tecidos periodontais decorrente do acúmulo de biofilme bacteriano, que pode resultar na perda progressiva de inserção conjuntiva e osso alveolar. A infecção bacteriana é a causa primária da doença periodontal. Para impedir que os micro-organismos se disseminem e invadam os tecidos, o hospedeiro responde a esta infecção por meio de processos imunológicos (ALBANDAR; RAMS, 2002; LÓPEZ; SMITH; GUTERREZ, 2002a, 2002b; TENG, 2006; XIONG et al., 2006).

Nas últimas décadas houve um progresso considerável na compreensão da doença periodontal, apontando para novos métodos de diagnóstico, prevenção, intervenção e novas estratégias de tratamento (DANTAS et al., 2004; VOGT, 2006). Adicionalmente, segundo Dantas et al. (2004), há indícios significativos do papel da DP como fator predisponente para o desenvolvimento ou exacerbação de problemas de ordem sistêmica levando ao aparecimento de uma nova linha de pesquisa denominada de “Medicina Periodontal”, conceito proposto por Willians e Offenbacher (2000), que corresponde a um ramo emergente da Periodontia que se refere às investigações científicas que apontem a influência da DP na saúde geral do indivíduo e vice-versa (BERTOLINI et al., 2007).

Em 1986, Løe et al. demonstraram em um estudo longitudinal a importância da resposta do hospedeiro num grupo de plantadores de chá do Sri Lanka. Os autores verificaram que embora vivendo sob as mesmas condições de saúde, dieta alimentar, higiene bucal e sem nenhum acesso a tratamento odontológico, os indivíduos apresentavam diferentes formas de destruição do tecido periodontal. Estes resultados permitiram compreender que fenômenos imunológicos, genéticos, microbianos, bioquímicos e patológicos afetariam a doença periodontal, assim como poderiam ter influência sobre a saúde geral, e promoveram grande avanço na percepção integral do indivíduo (BARILLI, 2003).

Na DP, os componentes e produtos bacterianos agredem o tecido periodontal adjacente, induzindo a formação de um infiltrado inflamatório intenso, com predominância de células polimorfonucleares (PMNs), plasmócitos, linfócitos e macrófagos, bem como síntese, secreção e ativação de uma série de mediadores

químicos pró-inflamatórios. Esta resposta inflamatória pode levar à destruição dos tecidos periodontais de suporte e às manifestações clínicas da doença (BOBETIS; BARROS; OFFENBACHER, 2006; DARVEAU; TANNER; PAGE, 1997; KLEBANOFF; SEARLE, 2006).

Nas últimas quatro décadas a saúde periodontal em gestantes tem sido muito estudada, no entanto, os resultados são controversos (GÜRSOY et al., 2008). Estudos envolvendo diferentes populações étnicas demonstraram que os tecidos orais podem ser afetados pela gravidez (COHEN et al., 1969; GÜRSOY et al., 2008; KORNMAN; LOESCHE, 1980; LÖE; SILNESS, 1963; TILAKARATNE et al., 2000). De acordo com Laine (2002), a gravidez não causa DP, mas pode agravar condições pré-existentes. A classificação usual da DP, afirma que a gengivite durante a gravidez é induzida pelo biofilme bacteriano e é afetada por fatores sistêmicos (ARMITAGE, 1999), com início relacionado à imunossupressão no segundo trimestre (LOPATIN et al., 1980).

Estudos sugerem uma relação entre a progressão da periodontite e os níveis de expressão de IL-1 (interleucina 1), IL-6 (interleucina 6), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral-alfa) e iNOS (óxido nítrico sintase induzível) em fluido crevicular gengival (GCF), tecidos gengivais e sangue, tanto em nível de proteína como de mRNA (BICKEL et al., 2001; CARRILLO-DE-ALBORNOZ et al., 2012; EJEIL et al., 2003; FAIZUDDIN; BHARATHI; ROHINI, 2003; FIGUERO et al., 2010; HIROSE et al., 2001; KENDALL et al., 2000; LAPPIN et al., 2000). No entanto, poucos estudos na espécie humana têm examinado a associação entre o aumento da inflamação gengival durante a gravidez e as repostas do sistema imune no local (CARRILLO-DE-ALBORNOZ et al., 2012; FIGUERO et al., 2010).

Neste contexto, este estudo se propõe a avaliar os níveis de expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e da enzima iNOS em gestantes com e sem doença periodontal, em comparação com a expressão dos mesmos genes em não gestantes com e sem doença.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Para facilitar a compreensão sobre o tema proposto serão abordados, inicialmente, os trabalhos na literatura relacionados à DP, a interação entre a DP e a gravidez, e a seguir, a relação entre os genes *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *iNOS* e a DP.

### 2.1 DOENÇA PERIODONTAL

A DP é uma das doenças infecciosas mais comuns da humanidade. Pode manifestar-se sob duas formas: a gengivite, caracterizada por alterações em tecidos moles; e a periodontite, caracterizada por alterações em tecidos moles e duros (osso, ligamento e cimento). Na periodontite, ocorrem reabsorção do osso alveolar e o desaparecimento das fibras que unem o osso ao dente, o que leva à perda da inserção do elemento dentário e à consequente formação de bolsa periodontal (ALBANDAR; RAMS, 2002; CHAZAN; AQUINO; MARIANI NETO, 2004; FERGUSON et al., 2007; OFFENBACHER et al., 2001).

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. Assim, a DP é causada pela infecção dos tecidos periodontais decorrente do acúmulo do biofilme bacteriano, que pode resultar na perda progressiva de inserção conjuntiva e osso alveolar (BOBETSIS; BARROS; OFFENBACHER, 2006; DARVEAU; TANNER; PAGE, 1997; KLEBANOFF; SEARLE, 2006).

O biofilme bacteriano é considerado fator etiológico da DP e os sinais clínicos são edema, alteração de cor, aumento do fluido sulcular e sangramento provocado ou espontâneo (BASSANI; LUNARDELLI, 2006). Em relação à evolução clínica e histológica, a DP desenvolve-se em estágios inicial, precoce, lesão gengival estabelecida (gengivite) e lesão periodontal avançada (periodontite) (KINANE; BERGLUNDH; LINDHE, 2010), o que depende diretamente da permanência dos depósitos bacterianos na superfície dental e também de como cada hospedeiro reage a esse estímulo. Confirmando esse conceito, Offenbacher et al. (1996) afirmaram que, embora a DP seja uma infecção crônica, causada por micro-organismos anaeróbios

Gram-negativos, a gravidade da doença parece ser modulada, principalmente, pela magnitude da resposta do hospedeiro.

Os processos inflamatórios presentes nos tecidos periodontais têm características diferentes de outros tecidos, sendo que, no epitélio juncional, a permeabilidade determina um processo contínuo de defesa de um sítio permanentemente colonizado por um grande número e variedade de micro-organismos como: *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* (BASSANI; LUNARDELLI, 2006).

Para impedir que os micro-organismos se disseminem e invadam os tecidos, o hospedeiro responde a esta infecção por meio de processos imunológicos (FLEMING, 1999). A resposta inflamatória é autolimitada, porém, quando a inflamação é desregulada ou quando o fator iniciador persiste, como ocorre na doença periodontal, a inflamação pode conduzir a um excessivo prejuízo tecidual (KENDALL; MARSHALL; BARTOLD, 2001). De acordo com Offenbacher et al. (1996), é evidente a participação de mecanismos celulares e moleculares do hospedeiro na perda da inserção dental.

A alta prevalência das diversas formas da DP em adultos tem sido descrita em vários estudos epidemiológicos conduzidos em diversas populações de idades variadas. No Brasil, segundo Oliveira (2006), a utilização da epidemiologia em saúde bucal tem tido, historicamente, uma atuação pouco expressiva.

O primeiro levantamento de saúde bucal de base nacional só foi realizado em 1986, pelo Ministério da Saúde (MS). Foram observadas as condições periodontais por meio do Índice Comunitário Periodontal das Necessidades de Tratamento Periodontal (CPITN) de 3.344 adultos na faixa etária de 35 a 44 anos. Os resultados obtidos para os sextantes da arcada superior foram: 16,86% de sextantes saudáveis; 11,46% com sangramento; 17,96% com cálculo; 6,17% com bolsa periodontal de 4 a 5 mm; 1,49% com bolsas de 6 mm ou mais; e 46% de sextantes nulos. Para os sextantes da arcada inferior os resultados foram: 16,34% de sextantes saudáveis; 11,10% com sangramento; 29,27% com cálculo; 7,43% com bolsa periodontal de 4 a 5 mm; 1,92% com bolsas de 6 mm ou mais; e 33,82% de sextantes nulos (BRASIL, 1988).

No levantamento nacional Projeto SB Brasil 2003, foi utilizado o Índice Periodontal Comunitário (IPC) para determinar a prevalência de DP. A porcentagem de pessoas sem nenhum problema periodontal nas faixas etárias de 35 a 44 anos de

idade foi 21,9% no Brasil. Quanto à doença periodontal grave (bolsas periodontais), a porcentagem de pessoas com bolsas periodontais maiores que 4 mm foi de 9,9% na faixa etária de 35 a 44 anos de idade. O número médio de sextantes afetados e a respectiva proporção em cada sextante do IPC, 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 ( $n = 0,05 - 0,83\%$ ). No grupo de 35 a 44 anos, observa-se uma diferença em relação aos dados de 1986 no percentual de sextantes com cálculo e uma menor proporção de sextantes excluídos, o que reflete uma maior manutenção dos dentes, na boca nesse grupo etário (BRASIL, 2004).

No último levantamento nacional, Projeto SB Brasil 2010, os resultados indicam que o percentual de indivíduos sem nenhum problema periodontal, no Brasil, foi de 17,8% para os adultos de 35 a 44 anos de idade. As formas mais graves da doença periodontal aparecem de modo mais significativo nos adultos (35 a 44 anos), em que se observa uma prevalência de 19,4%, sendo 15,2% rasas e 4,2%, profundas. Na região Sudeste, o número médio de sextantes afetados e a prevalência de sangramento, cálculo e bolsa periodontal rasa (3 a 5 mm) e profunda (6 mm ou mais), considerando a população adulta (35 a 44 anos) foram: sangramento ( $n = 1,49 - 47,9\%$ ); cálculo ( $n = 1,97 - 65,3\%$ ); bolsa rasa ( $n = 0,67 - 29,3\%$ ); bolsa profunda ( $n = 0,13 - 7,5\%$ ). As condições periodontais dimensionadas pelo CPI por sextante para a região Sudeste mostraram que nos adultos de 35 a 44 anos não foram verificadas diferenças significativas entre os sextantes para sangramento e, no sextante inferior central, a presença de cálculo foi a alteração periodontal mais observada. Menos de 20% de cada um dos sextantes apresentou bolsas periodontais rasas ou profundas, sendo o sextante superior central o menos acometido por essas condições (BRASIL, 2011).

A gravidade da doença varia conforme a faixa etária, tipo de infecção, problemas sistêmicos e fatores de risco (CHIAPINOTTO, 2000; MEDEIROS; CARVALHO, 1990; PAPAPANOU; LINDHE, 2010).

A condição dos tecidos periodontais, em gestantes, desperta interesse desde os anos 1960 (GÜRSOY et al., 2009). As gestantes apresentam alterações nos fatores associados à instalação/agravamento da DP, o que aumenta, neste grupo, a suscetibilidade a esta doença, conforme será relatado.

## 2.2 DOENÇA PERIODONTAL E GESTAÇÃO

A gestação representa um processo fisiológico, no ciclo de vida feminino, que envolve complexas mudanças físicas e emocionais. Ocorrem alterações hormonais típicas que representam uma adaptação orgânica para a manutenção da gravidez e que promovem alterações fisiológicas funcionais, anatômicas, sistêmicas e locais (ALVES; RIBEIRO; COSTA, 2007).

Gestantes estão sujeitas a alterações nos tecidos bucais relacionadas ao aumento da vascularização e permeabilidade vascular dos tecidos gengivais. Além disso, há uma resposta exacerbada dos tecidos moles do periodonto aos fatores irritantes locais (LAINE, 2002; MACHUCA et al., 1999; McCANN; BONCI, 2001; PASSANEZI; BRUNETTI; SANT'ANA, 2007; SARTÓRIO; MACHADO, 2001), que ocorrem em função dos níveis aumentados de estrógeno e progesterona, comuns durante a gravidez, e que predispõem estas mulheres ao desenvolvimento da DP (LAINE, 2002; MACHUCA et al., 1999; McCANN; BONCI, 2001; ROSELL; MONTANDON-POMPEU; VALSECKI JÚNIOR, 1999; SARTÓRIO; MACHADO, 2001; XAVIER; XAVIER, 2004).

Geralmente, as alterações inflamatórias dos tecidos periodontais iniciam-se no segundo mês de gestação e aumentam de gravidade no decorrer do período até o oitavo mês, ocorrendo uma redução acentuada no último mês (LÖE, 1965; LÖE; SILNESS, 1963).

Alguns estudos demonstraram que a prevalência da DP entre gestantes variou de 10,1% (RAMOS et al., 2006) a 100% (ROSELL; MONTANDON-POMPEU; VALSECKI JÚNIOR, 1999).

Em gestantes usuárias do serviço público da cidade de Juiz de Fora, MG, com idade entre 13 e 43 anos, a prevalência de DP, estimada por meio do CPITN, foi 87,8%. Entre as 26 adolescentes, a prevalência encontrada foi de 84,6%; entre as adultas de 88,11%. Entre as 47 gestantes, na faixa etária de 35 a 44 anos, sete eram hígdas e as outras quarenta apresentaram prevalência de DP igual a 85%. Quanto à gravidade da DP, 74% das gestantes apresentaram grau leve, 11% grau moderado e 3% grau grave, sendo que nenhum grau de perda de inserção foi encontrado em 84,6% das gestantes e 74,7% delas apresentaram sangramento à sondagem (OLIVEIRA, 2009).



Embora a maior suscetibilidade da inflamação periodontal, durante a gravidez, se deva às alterações nos níveis dos hormônios sexuais, estas, por si só, não desencadeiam as periodontites (ALVES; RIBEIRO; COSTA, 2007; CAMARGO; SOIBELMAN, 2005; GÜRISOY et al., 2008; LAINE, 2002).

Estudo de coorte, realizado por Figuero et al. (2010), foi desenhado para confirmar os relatos de exacerbação da inflamação gengival em gestantes e determinar se esta está associada a alterações nos níveis de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e IL-1 $\beta$  em GCF e/ou aumento nos níveis de hormônios sexuais salivares. Os resultados obtidos mostraram que a inflamação gengival aumentou significativamente durante a gravidez, apesar de escores de biofilme baixo. No entanto, as concentrações de PGE<sub>2</sub> e IL-1 $\beta$  não se alteraram durante a gravidez e a exacerbação da inflamação gengival não foi significativamente correlacionada com níveis mais altos de hormônios (progesterona e estradiol) salivares. Os autores concluíram que novos estudos com amostras maiores são necessários dentro deste campo.

Entretanto, os hormônios sexuais podem levar a uma modificação na ecologia subgengival, favorecer o aparecimento de determinados micro-organismos periodontopatogênicos e estimular a síntese de citocinas inflamatórias (GÜNCÜ; TÖZÜM; CAGLAYAN, 2005; KORNMAN; LOESCHE, 1980; MURAMATSU; TAKAESU, 1994; NEWMAN, 1985; ROMERO et al., 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997; YOKOYAMA et al., 2008).

Mais especificamente, os hormônios sexuais femininos estimulam o crescimento da bactéria anaeróbica Gram-negativa *Prevotella intermedia*, estreitamente associada ao início da DP, contribuindo para o nível aumentado desta bactéria nos sítios periodontais de gestantes (KORNMAN; LOESCHE, 1980, 1982). Jesen, Liljemark e Bloomquist (1981) observaram que durante o segundo trimestre de gestação, ocorre um aumento da gengivite e do sangramento gengival sem aumento de índices de biofilme e relacionaram esta ocorrência com um aumento maior na proporção de *Prevotella intermedia* em gestantes quando comparadas com as não gestantes. Yokotama et al. (2008), comparando a presença de cinco periodontopatógenos na saliva de 22 gestantes com 15 não gestantes, pela técnica do PCR, encontraram níveis mais altos de *Campylobacter rectus* na microbiota oral de gestantes. Os autores sugeriram que este achado esteja associado aos altos níveis de estradiol determinados nas gestantes. Carrillo-de-Albornoz et al. (2012), em estudo de coorte, avaliaram 48 gestantes no primeiro, segundo e terceiro trimestre e aos 3

meses após o parto e concluíram que durante os segundo e terceiro trimestres, a presença de *Porphyromonas gingivalis* contribui significativamente para o agravamento da inflamação gengival.

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 dos 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 (BOBETIS; BARROS; OFFENBACHER, 2006; BOGGESS et al., 2006; CONTRERAS et al., 2006; KATZ et al., 2006; XIONG et al., 2006), embora outros estudos questionem a associação (DAVENPORT et al., 2002; GOMES FILHO et al., 2006; NOACK et al., 2005; SANTANA et al., 2005).

O mais famoso e citado estudo a respeito deste assunto foi realizado por Offenbacher et al. (1996), no qual foram incluídas 124 gestantes, examinadas no máximo três dias após o parto. Os resultados mostraram que mães de bebês prematuros de baixo peso apresentavam um significativo grau de destruição periodontal, diferentemente daquelas que tiveram filho a termo. Os autores sugeriram a hipótese de que as associações de patógenos anaeróbios Gram-negativos do periodonto com endotoxinas e mediadores inflamatórios maternos poderiam ter um possível efeito adverso no desenvolvimento do feto.

As evidências demonstram que a associação positiva entre essa patologia bucal e o nascimento prematuro e de baixo peso é mantida, mesmo quando são controlados outros fatores que contribuem para esta ocorrência (DASANAYAKE, 1998; DAVENPORT et al., 1998; JEFFCOAT et al., 2001; OFFENBACHER et al., 1996; OFFENBACHER et al., 1998b; OFFENBACHER et al., 2001), o que permite incluir a DP entre os fatores associados à prematuridade e ao baixo peso da criança ao nascer (BARROS; MOLITERNO, 2001; BRUNETTI, 2002; GAFFIELD et al., 2001; LAINE, 2002; LOURO; FIORI, 2001; MOKEEN, MOLLA; AL-JEWAIR, 2004).

Estudos relatam que essa associação se baseia no fato de que o periodonto, quando está infectado, libera mediadores, os quais além de presentes na reação inflamatória são responsáveis também pela indução ao parto prematuro, ou seja,

quanto mais grave for a DP, maior a quantidade de mediadores produzidos e maior o risco para o parto prematuro (COTRAN et al., 1996; DAMARE; WELLS; OFFENBACHER, 1997; OFFENBACKER et al., 1998a).

Pelo exposto, fica claro que a relação entre DP, gestação e mediadores inflamatórios é controversa. Assim, estudar a expressão de mediadores inflamatórios nas gestantes é relevante para esclarecer o mecanismo da relação entre gravidez e doença periodontal.

### 2.3 RESPOSTA IMUNE E DOENÇA PERIODONTAL

Conforme mencionado anteriormente, na DP os componentes e produtos bacterianos agredem o tecido periodontal adjacente, induzindo a formação de um infiltrado inflamatório intenso, com predominância de PMNs, plasmócitos, linfócitos e macrófagos, bem como a síntese, secreção e ativação de uma série de mediadores químicos pró-inflamatórios como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) e óxido nítrico (NO) (HIROSE et al., 2001; KENDALL; MARSHALL; BARTOLD, 2001; KENDALL et al., 2000; KINANE; BERGLUNDH; LINDHE, 2010; MATEJKA et al., 1998).

Sugere-se que as lesões periodontais são reguladas pela combinação das funções dos linfócitos T *helper* (Th1 e Th2). As respostas mediadas por linfócitos Th1 que consistem, predominantemente, de uma resposta imune celular e pró-inflamatória, secretam IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , sendo este último um importante amplificador da ativação de macrófagos. Os linfócitos Th2, por outro lado, com características anti-inflamatórias, de resposta imune predominantemente humoral, secretam preferencialmente as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; FERREIRA; TEIXEIRA, 2005; KINANE; BERGLUNDH; LINDHE, 2010).

Estudos têm sugerido a relação entre a progressão da DP e a expressão das IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e iNOS no fluido do sulco gengival ou no tecido gengival (HIROSE et al., 2001; KENDALL et al., 2000; LAPPIN et al., 2000; MILLER et al., 2006). Segundo Hirose et al. (2001), na progressão da DP, a expressão da IL-6 pode refletir a inflamação do tecido gengival, e a iNOS pode estar envolvida no processo

inflamatório da periodontite. Os autores demonstraram ainda, que, na presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, a expressão de IL-1 está aumentada.

Além disso, estudos indicam que a IL-1 $\beta$  é um biomarcador importante para ocorrência de DP, sendo um mediador crítico na resposta imune inata aguda que ocorre em consequência de componentes microbianos (OFFENBACHER et al., 2006). Indivíduos com DP apresentam níveis salivares significativamente maiores de IL-1 $\beta$  que indivíduos sem doença (MILLER et al., 2006; TOBÓN-ARROYAVE; JARAMILLO-GONZÁLEZ; ISAZA-GUSMÁN, 2008). Miller et al. (2006) ainda sugeriram que casos de DP agressiva estão relacionados com alta concentração de IL-1 $\beta$  na saliva. Por outro lado, Tobón-Arroyave, Jaramillo-González e Isaza-Gusmán (2008) não encontraram diferença estatisticamente significativa nos níveis de concentração de IL-1 $\beta$  na saliva, entre os grupos com periodontite crônica e agressiva. Yen Bee Ng et al. (2007) relacionaram a perda óssea alveolar, decorrente da DP, com achados de alta concentração de IL-1 $\beta$  na saliva, embora esta correlação não tenha sido encontrada em todos os pacientes avaliados. Estudo realizado por Ejeil et al. (2003), em amostras de tecido gengival de sítios sem inflamação e com leve, moderada e grave inflamação gengival, encontraram concentrações mais elevadas de IL-1 $\beta$  quando comparados com sítios não inflamados. Segundo estes autores, a produção excessiva e/ou contínua de citocinas, como a IL-1 $\beta$ , pode ser considerada um marcador da gravidade clínica da periodontite.

As várias propriedades da classe da IL-1 são decorrentes de seu efeito na regulação de outros genes. A IL-1 age diretamente em um grupo de genes expressos durante a inflamação. Cerca de noventa genes são afetados pela IL-1, entre os quais incluem-se genes ativadores para outras citocinas, receptores de citocinas, fatores de crescimento, enzimas de remodelação tecidual, componentes da matriz extracelular e para adesão molecular (DINARELLO, 1996).

A IL-1 $\beta$ , em conjunto com o TNF- $\alpha$ , podem ser os desencadeadores de reações inflamatórias que conduzem à reabsorção e destruição óssea na DP (KINANE; BERGLUNDH; LINDHE, 2010; NICOLAU; RAPOPORT; SELKI, 2003).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por macrófagos, com papel biológico similar ao da IL-1. Induz a secreção de colagenase, PGE<sub>2</sub> e IL-6 por fibroblastos humanos e em cultura de células ósseas humanas. Possui importantes atividades imunológicas e estimula, também, a reabsorção óssea

pelos osteoclastos, embora seja quinhentas vezes menos potente que a IL-1 (ALEXANDER; DANOULIS, 1994).

A citocina IL-6 é conhecida por ser um importante modulador inflamatório nas reações inflamatórias crônicas locais. Tem a função de recrutar macrófagos e ativar a resposta imune adquirida, além de ser considerada como um dos marcadores mais sensíveis à resposta das infecções e inflamações na fase aguda (DASHASH et al., 2008; ROMANO et al., 1997). Ao contrário da IL-1 $\beta$ , o estímulo para síntese de IL-6 não é microbiano; esta é sintetizada normalmente como consequência do aumento dos níveis de IL-1 e TNF- $\alpha$ , o que representa uma segunda onda de mediadores inflamatórios. No entanto, como a IL-1 $\beta$ , quando a IL-6 persiste dentro dos tecidos pode servir para mediar a destruição do tecido conjuntivo, aumentando a diferenciação e ativação de osteoclastos, fibroblastos e expressão de metaloproteínas (OFFENBACHER et al., 2006; ROMANO et al., 1997).

A DP estimula a síntese de mediadores químicos do processo inflamatório, dentre os quais, em especial, as prostaglandinas, que aumentam o risco de nascimentos prematuros de baixo peso, uma vez que estes mediadores químicos são responsáveis pelas contrações uterinas (GAFFIELD et al., 2001; LAINE, 2002).

A PGE<sub>2</sub>, o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e a IL-6, além de estarem presentes na reação inflamatória, encontram-se, também, atuando no trabalho de parto como mediadores fisiológicos, em maiores concentrações no fluido amniótico (DAMARE; WELLS; OFFENBACHER, 1997; DASHASH et al., 2008; OFFENBACHER et al., 1996). O óxido nítrico (NO) contribui para a vasodilatação sistêmica materna, regula o fluxo sanguíneo uterino e feto-placentário (COSTA et al., 2007). Esses mediadores estão presentes na fisiologia normal do parto e, quando em excesso, podem acelerar o processo, atuando como gatilho para o parto prematuro (BARROS; MOLITERNO, 2001; LOESCHE, 1997; OFFENBACHER et al., 1998a; OFFENBACHER et al., 2001).

Dentre as citocinas, o IFN- $\gamma$  foi caracterizado como o principal ativador de macrófagos. O IFN- $\gamma$  induz a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), NO e outras moléculas tóxicas responsáveis pela atividade microbiana dos macrófagos (STOIKA et al., 2001).

O NO é uma molécula reguladora produzida principalmente por macrófagos ativados, de extrema importância nos processos de resposta imune, inflamação, metabolismo ósseo e apoptose. Essa molécula pode apresentar efeitos benéficos, tais como atividade antimicrobiana e modulação da resposta imune. Por outro lado,

segundo Dusse, Vieira e Carvalho (2003), o NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas e tem um papel de mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais.

A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO sintase (NOS). Estudos bioquímicos e análise sequencial de aminoácidos revelaram que estas isoformas representam uma família de proteínas e, aparentemente, são produtos de três genes distintos. Assim, as isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (cNOS), dependente de íons cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a iNOS, produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; HIROSE et al., 2001; KENDALL; MARSHALL; BARTOLD, 2001).

Em tecidos humanos, o NO produzido pode estar envolvido na patogênese da DP, atuando em fenômenos imunorreguladores, antimicrobianos ou destrutivos (BATISTA et al., 2002; HIROSE et al., 2001; KENDALL et al., 2000; LAPPIN et al., 2000). O interesse sobre a atuação do NO na patogênese de doenças periodontais tem aumentado. Contudo, poucos estudos discutiram o seu papel nas condições fisiológicas e patológicas da região periodontal (HIROSE et al., 2001; UGAR-ÇANKAL; OZMERIC, 2006).

Alguns estudos humanos examinaram a associação entre o aumento da inflamação gengival durante a gravidez e as mudanças no sistema imune local. Yalcin et al. (2002) encontraram baixos níveis de  $\text{PGE}_2$ , no GCF, durante o segundo e terceiro trimestre em gestantes tratadas com raspagem e alisamento radicular. Os autores concluíram que níveis de  $\text{PGE}_2$  poderiam ser considerados como um marcador de inflamação gengival durante a gravidez, embora reconhecessem a falta de um grupo controle de gestantes não tratadas. Os resultados obtidos no estudo de Figuero et al. (2010) confirmam a presença da exacerbação da inflamação gengival durante a gravidez, que é especialmente marcada em dentes anteriores, mas esta exacerbação não estaria associada ao aumento das concentrações de progesterona ou estradiol ou com as mudanças nos  $\text{PGE}_2$  ou  $\text{IL-1}\beta$  no GCF, uma vez que as gestantes na primeira visita já tinham um elevado índice gengival. Quando comparado com o grupo não gestantes, diferença significativa ( $p < 0,001$ ) nas concentrações de progesterona e estradiol foram encontrados. Níveis de  $\text{IL-1}\beta$  foram significativamente

mais baixos no grupo não gestantes em relação ao grupo gestantes ( $p < 0,001$ ) e os níveis de  $PGE_2$  foram semelhantes entre os grupos, sem diferenças significativas para primeiro ou terceiro trimestre ( $p > 0,05$ ). Recentemente, Carrillo-de-Albornoz et al. (2012) relataram um aumento progressivo nos níveis de IL-6 no GCF durante a gravidez que diminui significativamente após o parto, concomitante com a queda na produção hormonal. Os níveis de TNF- $\alpha$  mostraram uma redução significativa no terceiro trimestre de gravidez, e aumenta após o parto. No entanto, os autores concluíram que estes biomarcadores não poderiam estar associados com a condição inflamatória gengival presente durante a gravidez.

Assim, a realização de novas investigações tem sido sugerida, a fim de que o conhecimento sobre os mediadores sejam divulgado a um maior número de profissionais, bem como novas aplicações clínicas sejam viabilizadas.

#### 2.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi descrita pela primeira vez em 1985 por Kary Mullis e colaboradores e revolucionou a análise de ácidos nucleicos na biologia molecular (SANTOS et. al., 2004). O método de PCR em Tempo Real monitora a reação a cada ciclo, com a associação da amplificação do alvo em cada ciclo com a emissão de uma determinada quantidade de fluorescência. O aumento na quantidade de fluorescência emitida em cada ciclo é proporcional à quantidade do produto gerado, o que torna possível monitorar a quantidade de produto gerada em cada ciclo e, durante a fase exponencial da reação, a quantidade de fragmento gerado é proporcional à quantidade inicial. Este método é muito sensível, podendo ser usado para quantificar RNA mensageiro (mRNA) em baixos níveis e tem se mostrado uma poderosa ferramenta na quantificação da expressão gênica, ao contrário da PCR convencional que não pode ser usada em estudos que visem quantificar ou mesmo medir diferenças de níveis de expressão de diferentes amostras.

Várias metodologias de quantificação baseada em PCR em Tempo Real vêm sendo desenvolvidas atualmente e variam quanto à especificidade do alvo de amplificação, custo e precisão. Dentre estas metodologias podem ser citadas: *TaqMan*<sup>®</sup>, *SYBR Green*<sup>®</sup>, *Molecular Beacons*<sup>®</sup> e *Lux*<sup>®</sup> primers.

Neste estudo as reações de PCR são feitas utilizando-se o *SYBR Green*<sup>®</sup> *PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Austin, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

O sistema *SYBR Green*<sup>®</sup> utiliza um fluoróforo como sistema de detecção não específico, que se liga a qualquer dupla fita de DNA gerada durante a reação de PCR, emitindo fluorescência. O uso deste método de detecção tem sido bastante utilizado em ensaios de PCR em Tempo Real, pois tem a vantagem de ser mais barato em relação à construção de sondas marcadas. Um aspecto importante para indicação do uso de *SYBR Green*<sup>®</sup> é que os *primers* específicos, utilizados na reação de PCR, devem ser desenhados cuidadosamente para evitar a amplificação de produtos não específicos e formação de dímeros, uma vez que esse corante se liga a qualquer dupla fita de DNA (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLÉ, 2002).

Durante a fase exponencial de amplificação, é possível determinar um valor de intensidade de fluorescência, na qual todas as amostras podem ser comparadas. Este valor é denominado Limiar (*threshold*) e é calculado em função da quantidade de fluorescência basal (*background*). Neste ponto, o sinal de fluorescência gerado por cada amostra é significativamente maior que a fluorescência basal. A quantidade de ciclos de PCR requeridos para que a amostra emita fluorescência suficiente para este ponto é definido como  $C_t$  (*cycle threshold*). O  $C_t$  é específico para cada amostra e é inversamente proporcional à quantidade inicial do alvo presente na reação (PFAFFL, 2006).

Os dados de quantificação de expressão gênica podem ser analisados de duas formas: quantificação absoluta ou relativa. Na quantificação absoluta, o número de cópias de mRNA é determinado pela construção de uma curva padrão. A quantificação relativa, ou método comparativo, determina a quantidade de expressão de um gene alvo em uma determinada amostra relativa à outra de referência (tal como uma amostra controle não tratada ou no tempo zero – calibrador) (PFAFFL, 2006; PFAFFL; HORGAN; DEMPFLÉ, 2002). Este método é o mais utilizado quando existem muitos genes a serem testados em grandes números de amostras e tem a vantagem de não necessitar da construção de curvas padrão, embora as eficiências de amplificação dos genes alvo e controle endógeno tenham que ser similares, para a obtenção de resultados confiáveis.



### **3 HIPÓTESE**

Existe diferença na expressão gênica das citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) e da enzima óxido nítrico induzível (iNOS) no tecido gengival de gestantes com e sem DP em comparação com mulheres não gestantes portadoras e não portadoras da doença.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão gênica de citocinas inflamatórias ( $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $TNF-\alpha$ ) e da enzima óxido nítrico induzível (iNOS) no tecido periodontal de gestantes e não gestantes.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e avaliar a expressão dos genes  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $TNF-\alpha$  e  $iNOS$  no tecido gengival de gestantes sem DP, em comparação com a expressão dos mesmos genes em não gestantes sem doença.
- Identificar e avaliar a expressão dos genes  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $TNF-\alpha$  e  $iNOS$  no tecido gengival de gestantes sem DP, em comparação com a expressão dos mesmos genes em gestantes com doença.
- Identificar e avaliar a expressão dos genes  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $TNF-\alpha$  e  $iNOS$  no tecido gengival de não gestantes com DP, em comparação com a expressão dos mesmos genes em não gestantes sem doença.
- Identificar e avaliar a expressão dos genes  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $TNF-\alpha$  e  $iNOS$  no tecido gengival de não gestantes com DP, em comparação com a expressão dos mesmos genes em gestantes com doença.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

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

- MEDLINE.
- SCIELO (*Scientific Electronic Library Online*).
- Pubmed.
- LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde).
- Bibliografia Brasileira de Odontologia (BBO).
- Literatura do Caribe em Ciências da Saúde (MEDCARIBE).
- Sistema de Informação da Biblioteca da OMS (WHOLIS).
- Revisões Sistemáticas da Colaboração Cochrane (COCHRANE).

Uma pesquisa ativa de fontes não indexadas em revistas, livros e trabalhos monográficos foi também realizada. Na busca, foram utilizados os unitermos, listados abaixo, isoladamente e/ou combinados entre si em português e inglês:

- Periodontia.
- Doença periodontal.
- Gravidez.
- Gestação.
- Gengivite gravídica.
- Citocinas.
- Óxido nítrico.
- Citocinas pró-inflamatórias.

## 5.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional, transversal ou seccional.

## 5.3 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo seguiu as normas e diretrizes da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – MS para pesquisa em seres humanos.

O projeto de pesquisa foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), tendo sido aprovado em 28 de agosto de 2008 (Parecer nº 263/2008 – Anexo A).

## 5.4 POPULAÇÃO DE ESTUDO

De um total de 120 mulheres examinadas, 32 mulheres foram incluídas no presente estudo, no período entre novembro de 2009 e novembro de 2010. As gestantes foram recrutadas durante visitas de rotina de consulta pré-natal no Serviço Público de Saúde Municipal e encaminhadas para o Projeto Só-Riso – Atenção Materno-Infantil, Projeto de Extensão da Faculdade de Odontologia da UFJF, enquanto as não gestantes foram recrutadas no Departamento de Recepção da Faculdade de Odontologia da UFJF.

As mulheres selecionadas foram distribuídas em quatro grupos (n = 8 cada) da seguinte maneira:

- Grupo GD: gestantes com doença periodontal.
- Grupo GND: gestantes sem doença periodontal.
- Grupo NGD: não gestantes com doença periodontal.
- Grupo NGND: não gestantes sem doença periodontal.

#### **5.4.1 Critérios de inclusão**

Participaram deste estudo mulheres com bom estado de saúde geral, de 18 a 40 anos de idade (AGUEDA et al., 2008; MANAU et al., 2008), com 15 dentes ou mais na cavidade bucal (VETTORE et al., 2008). Entre as gestantes, foram incluídas aquelas que estavam no segundo trimestre de gravidez (entre 13 e 24 semanas) (BRASIL, 2006), sendo a idade gestacional confirmada por exame de ultrassom.

#### **5.4.2 Critérios de exclusão**

Foram excluídas as mulheres portadoras de diabetes mellitus, imunossupressão por comprometimento sistêmico, hipertensão arterial, que estivessem sob tratamento ortodôntico, realização de profilaxia dentária profissional, tratamento dentário ou periodontal nos últimos seis meses, tabagistas, etilistas ou usuárias de drogas ilícitas, em uso de medicação anticonvulsivante, ansiolítica, ou antibiótica nos últimos três meses. Entre as gestantes foram excluídas ainda aquelas com gestação múltipla, com diagnóstico de má-formação fetal e história de aborto conforme critérios utilizados nos estudos de Agueda et al. (2008) e Vettore et al. (2008).

### **5.5 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **5.5.1 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 do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

Para todas as mulheres incluídas no estudo, foi preenchido pelo pesquisador um prontuário estruturado (Apêndice B) com registro dos seguintes dados: (I) dados de identificação; (II) dados demográficos e socioeconômicos, segundo critérios da ABEP (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE PESQUISA, 2003); (III) inventário de saúde com dados das condições de saúde geral, atendimento odontológico, história da gestação atual e das gestações anteriores, quando houvesse, para as gestantes; e (IV) avaliação da condição periodontal.

### **5.5.2 Entrevista**

A entrevista com as mulheres foi realizada com o propósito de colher 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 pela pesquisadora no prontuário elaborado. Posteriormente, as voluntárias foram submetidas ao exame periodontal.

### **5.5.3 Exame periodontal**

O exame foi realizado pela pesquisadora, previamente treinada e calibrada, sob luz artificial, com a paciente sentada em cadeira odontológica. As condições bucais foram avaliadas utilizando-se os seguintes instrumentais/materiais: espelhos planos nº 5 com cabo, sonda periodontal (Hu-Friedy®, Chicago, IL, USA) e compressas de gaze esterilizadas.

A condição periodontal foi avaliada com a utilização de três indicadores: Índice Periodontal Comunitário (CPI), Nível de Inserção Clínico (NIC) e Sangramento à Sondagem (SS), segundo critérios da Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997). Para cada um dos indicadores utilizados, considerou-se o maior valor encontrado entre os sítios examinados em cada dente.

➤ Índice Periodontal Comunitário (CPI)

Este índice avalia três indicadores das condições atuais do periodonto: sangramento gengival, cálculo dentário e bolsas periodontais.

Na sistemática do exame periodontal, foram examinados todos os dentes permanentes presentes na cavidade bucal, com exceção dos terceiros molares, em seis sítios (mésio-vestibular, centro da face vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, centro da face lingual e disto-lingual), utilizando-se uma sonda periodontal como instrumento sensor na determinação da profundidade da bolsa periodontal, na detecção de cálculos subgengival, na profundidade de bolsa periodontal e no sangramento gengival como resposta. O movimento iniciou-se pela superfície disto-vestibular do segundo molar superior direito passando-se pela área média e para a área mésio-vestibular, mantendo-se a sonda paralela ao longo eixo do dente, com movimentos curtos e suaves no sulco gengival. A força empregada não deveria ser superior a 20 g. Procedimento semelhante foi executado na face lingual destes dentes (LINDHE; KARRING; LANG, 2010). A condição periodontal foi registrada conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 – Código do registro do CPI e condição periodontal.

<b>Código</b>	<b>Condição periodontal</b>
0	Hígido (Saúde periodontal).
1	Sangramento gengival observado diretamente ou através do espelho clínico, após sondagem.
2	Cálculos detectados durante a sondagem (toda a área preta da sonda visível).
3	Presença de bolsa periodontal de 4 a 5 mm (margem gengival cobrindo, mas não totalmente a tarja preta da sonda).
4	Presença de bolsa com 6 mm ou mais (tarja preta não visível).

➤ Nível Clínico de Inserção (NIC)

O nível de inserção clínico tem como referência a distância, em milímetros, da junção amelocementária (JAC) até o fundo da bolsa periodontal ou sulco gengival.

➤ Sangramento à sondagem (SS)

Este índice foi desenvolvido para avaliar a presença ou ausência de sinais inflamatórios e sangramento após sondagem periodontal. A sonda periodontal percorre o sulco gengival nos mesmos dentes utilizados nos índices anteriores por

vestibular e lingual e, em seguida, observa-se a presença ou não de sangramento no sulco gengival (BASSANI; LUNARDELLI, 2006).

O resultado foi anotado de forma dicotômica conforme especificado no Quadro 2.

Quadro 2 – Registro do índice de sangramento à sondagem.

<b>Código</b>	<b>Resposta gengival</b>
0	Sem sangramento.
1	Sangramento gengival.

#### **5.5.4 Definição de doença periodontal**

Neste estudo, foi diagnosticado como DP, a presença de quatro ou mais dentes com um ou mais sítios apresentando uma profundidade de bolsa periodontal maior ou igual a 4 mm e nível clínico de inserção maior ou igual a 3 mm (LÓPEZ; SMITH; GUTERREZ, 2002a, 2002b).

Foi diagnosticado como gengivite ou periodontite leve, a presença de vermelhidão e sangramento gengival à sondagem em mais de 25% dos sítios (LÓPEZ; SMITH; GUTERREZ, 2002b).

#### **5.5.5 Coleta de tecido gengival**

A coleta de tecido gengival das voluntárias foi realizada sob anestesia local com lidocaína 2% com adrenalina. Nas mulheres com DP, a coleta foi realizada em um sítio em que havia, concomitantemente, necessidade de tratamento e maior profundidade de bolsa; nas mulheres sem DP, a coleta foi realizada na distal do segundo molar antes da exodontia dos terceiros molares. Foi realizada uma incisão de bisel invertido para obtenção do tecido da porção interna da papila. As amostras gengivais incluíram parte da bolsa epitelial, tecido conjuntivo e tecido de granulação (PAN et al., 2010). As amostras (aproximadamente de 30 a 100 mg) foram



imediatamente identificadas e imersas em 1,5 mL de RNAlater<sup>®</sup> (Ambion, Austin, TX, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O RNAlater<sup>®</sup> é um reagente aquoso, não tóxico indicado para preservar e estabilizar o RNA celular de amostras frescas de tecidos ou células em solução, deixando o RNA intacto mesmo quando não congelado.

As amostras de tecido gengival foram armazenadas primeiramente a 4°C por no mínimo 12 horas e estocadas a uma temperatura de -20°C para posterior extração de RNA.

### **5.5.6 Análise laboratorial**

#### **5.5.6.1 Extração de RNA total**

As amostras de tecido gengival foram analisadas no Laboratório de Genética Molecular Dr. Mário Luiz Martinez da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora (Anexo B). O RNA total das amostras de tecido gengival foi extraído utilizando-se o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) conforme as recomendações do fabricante.

Os microtubos das amostras de tecido gengival das voluntárias foram removidos do freezer a -20°C e descongelados por meio de imersão em gelo comum. Os instrumentos e/ou equipamentos como: pinça; pipetas; bancada e balança de precisão, foram limpos com RNase Remover<sup>™</sup> Spray (Biosolve Ltd., Valkenswaard, Holanda). Os tecidos foram retirados da solução conservante RNAlater<sup>®</sup> (Ambion) com a pinça e drenou-se o excesso de líquido. Cada amostra de tecido foi colocada em superfície limpa, cortada em pedaços menores, com lâmina de bisturi, para facilitar a homogeneização e pesada em balança de precisão. Após a pesagem, o tecido foi colocado em um microtubo 2,0 mL previamente identificados contendo 600 µL do tampão RLT (fornecido no kit de extração de RNA – Qiagen) e 6 µL β-mercaptoetanol (β-ME) e homogeneizado imediatamente, com homogeneizador (ULTRA-TURRAX – IKA<sup>®</sup> T 10 Basic, Staufen, Alemanha) com velocidade de 20.000 rpm por 45 a 60 s até distribuição uniforme da amostra. Este procedimento evita perda de produtividade e entupimento da coluna. As amostras foram centrifugadas

por 3 min. a 10.000 x g e os restos celulares formaram um pelete. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo de 2,0 mL e adicionou-se o mesmo volume de etanol 70%, homogeneizando com a pipeta. Foram transferidos 700 µL da amostra incluindo qualquer precipitado formado para uma coluna RNeasy<sup>®</sup> colocada em um tubo coletor e centrifugado por 15 s a 10.000 x g. Após a centrifugação, o efluxo foi descartado e o mesmo tubo coletor reutilizado para adicionar o volume restante e repetido o passo anterior até passar todo o volume pela coluna. Pipetou-se 350 µL de tampão RW1 na coluna, centrifugou-se por 15 s a 10.000 x g e o efluxo foi novamente descartado.

Foi preparado o *DNase I Incubation Mix* (10 µL de DNase I – 2,73 Kunitz/µL + 70 µL de tampão RDD) e 80 µL desta solução foi adicionada diretamente na membrana da coluna e incubada a temperatura ambiente por 15 min. Pipetou-se 350 µL de tampão RW1 na coluna, centrifugou-se por 15 s a 10.000 x g e o efluxo foi descartado. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor, pipetou-se 500 µL de tampão RPE na coluna, centrifugou-se por 15 s a 10.000 x g e o efluxo foi novamente descartado. Adicionou-se 500 µL de tampão RPE à coluna, centrifugou-se por 2 min. a 10.000 x g e descartou-se o efluxo. Foi realizada uma nova centrifugação por 1 min para secar a membrana da coluna e não restar nenhum resíduo de álcool, presente no tampão RPE. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL previamente identificado e aplicado 50 µL de água-*RNase free* (fornecida no kit) diretamente na membrana da coluna e centrifugado por 2 min. a 10.000 x g para eluir o RNA. Após a centrifugação a coluna foi descartada e o RNA total armazenado a -70°C. Antes de ser armazenado foi realizado a quantificação das amostras de RNA total por espectrofotometria utilizando-se o *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA) e sua qualidade avaliada utilizando-se o equipamento Bionalyzer (Agilent, Palo Alto, EUA). A média do número de integridade do RNA (RIN – *RNA Integrity Number*) das amostras foi 7,1.

#### 5.5.6.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando-se o SuperScript<sup>™</sup> III First-Strand Synthesis System SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as

recomendações do fabricante. Em 8  $\mu\text{L}$  de RNA total foram adicionados 1  $\mu\text{L}$  oligo(dT)<sub>20</sub> (50  $\mu\text{M}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (10 mM), correspondendo a um volume total de 10  $\mu\text{L}$ . A reação foi incubada a 65°C durante 5 min e, posteriormente, incubada em gelo por 1 min. Enquanto isso foi preparado o *cDNA Synthesis Mix*, adicionando os seguintes componentes: 2  $\mu\text{L}$  10X RT buffer, 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 nM), 2  $\mu\text{L}$  de DTT (0,1 M), 1  $\mu\text{L}$  RNase OUT (40 U/ $\mu\text{L}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  de SuperScript III RT (200 U/ $\mu\text{L}$ ). Em seguida, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  deste mix à reação e incubada a temperatura de 50°C por 50 min. e a 85°C por 5 min. para inativação enzimática, sendo então, armazenada em gelo por 1 min. Após este tempo foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de RNase H em cada tudo e incubado a 37°C por 20 min.

As concentrações médias do cDNA das amostras foram estimadas por espectrofotometria e logo após armazenadas a -20°C até o uso na PCR em Tempo Real.

### 5.5.6.3 PCR em Tempo Real

A análise da expressão dos genes *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  e *iNOS* foi feita utilizando-se a metodologia de PCR em Tempo Real. Os *primers* utilizados para avaliar a expressão dos genes foram desenhados usando o programa *Primer Express* (Applied Biosystem) a partir de sequências obtidas do banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e conforme dados da literatura. Como referência endógena foram utilizados os genes *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) e  *$\beta$ -actina*, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequências dos *primers* utilizados na PCR em Tempo Real.

Gene	Sequência	Amplicon (bp)	Referência ou ID*
<i>IL-1 <math>\beta</math></i>	F: GCACGATGCACCTGTACGAT R: AGACATCACCAAGCTTTTTTGCT	69	BC008678.1
<i>IL-6</i>	F: CCAGGAGCCCAGCTATGAAC R: GAGCAGCCCCAGGGAGAA	70	AK301141.1
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	F: CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG R: CCTTGGTCTGGTAGGAGACG	325	Hirose et al., 2001
<i>iNOS</i>	F: CCTCGGCTCCAGCATGTAC R: TGGGACAGCTTCTGATCAATG	66	NM_002046
<i>GAPDH</i>	F: GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA R: GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT	127	Douglas et al., 2008
<i><math>\beta</math> actina</i>	F: TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA R: CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG	661	Hirose et al., 2001

\*ID no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

A PCR em Tempo Real foi realizada utilizando-se o *SYBR Green® PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Neste kit estão incluídos todos os componentes para a realização das reações de PCR: *2X Reaction Buffer*, 0,4 mM dATP, 0,4 mM dGTP, 0,8 nM dUTP, iTaq DNA polymerase (50 U/mL), 6 mM Mg<sup>+2</sup>, SYBER Green I dye, 1 µM ROX. Além disso, foram adicionados o par de primers e o cDNA. As reações contaram de 12,5 µL desse mix; 100, 200 ou 400 ng de cDNA; 50, 100 ou 200 nM de primer e água, totalizando um volume final de 25 µL.

Antes da quantificação em Tempo Real, as reações foram otimizadas para todos os genes. Para tanto, foram testadas três quantidades de cDNA (100, 200 e 400 ng/reação) e três concentrações de *primer* (50, 100 e 200 nM). Cada amostra foi feita em duplicata em placas ópticas de reação de 96 poços, seladas com filme adesivo óptico e amplificadas no *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sendo cada alvo amplificado separadamente. As condições das reações foram 95°C por 5 min. de desnaturação, seguida por 40 ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. de anelamento e extensão.

Os dados obtidos durante a reação de PCR em Tempo Real, gerados pelo equipamento foram exportados para arquivos de planilhas do tipo Excel® para posterior análise estatística.

## 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 5.6.1 Análise descritiva

A análise estatística foi realizada usando o pacote estatístico SPSS® versão 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) para os dados clínicos. Dados nominais foram descritos por frequências relativas e absoluta e os dados numéricos foram descritos usando a média e desvio padrão.

### 5.6.2 Análise dos dados de PCR em Tempo Real

Após a determinação das melhores condições, as diluições seriadas de cDNA foram plotadas contra seus respectivos  $C_t$  para cálculo da eficiência de amplificação do alvo e dos controles endógenos, pois na quantificação relativa é necessário que essas eficiências sejam aproximadamente iguais. A Eficiência foi calculada pelo programa REST<sup>®</sup> 2009, o qual emprega a fórmula  $E = 10^{(-1/\text{inclinação da reta})} - 1$ , em que E é a eficiência da reação, que teoricamente varia de 0 a 1, sendo 1 considerado o valor ótimo (PFAFFL, 2006).

De acordo com o cálculo de eficiência da reação de PCR foram determinadas as melhores concentrações de *primers* e cDNA para os genes *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *iNOS* e os controles endógenos  *$\beta$ -actina* e *GAPDH*, como mostra a Tabela 2. Durante a curva de dissociação não foram observados picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos.

Tabela 2 – Concentração de *primer* e cDNA, eficiência da reação e temperatura de dissociação (TD) do fragmento amplificado para cada gene.

Gene	Primer (nM)	cDNA (ng/reação)	Eficiência	TD (°C)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	50	400	0,8	78,5
<i>IL-6</i>	100	400	0,9	81,4
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	50	100	0,9	86,2
<i>iNOS</i>	100	400	0,9	79,0
<i>GAPDH</i>	200	100	0,8	81,7
<i><math>\beta</math> actina</i>	50	100	0,9	86,5

Posteriormente, foi realizada a quantificação relativa das amostras baseada no método descrito por Pfaffl (2006) que utiliza a seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade Relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta C_t_{\text{alvo}}}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta C_t_{\text{Ref}}}}$$

Em que:

$E_{\text{Alvo}}$  = Eficiência da reação de PCR dos genes alvo (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *iNOS*).

$E_{\text{Ref}}$  = Média geométrica da eficiência de reação dos controles endógenos ( *$\beta$ -actina*, *GAPDH*).

$\Delta C_t$  =  $C_t$  controle -  $C_t$  amostra

Controle = não gestantes com e sem doença periodontal.

Amostra = gestantes com e sem doença periodontal.

Os dados obtidos foram analisados pelo programa REST<sup>®</sup> 2009 (*Corbett Research e M.Pfaffl – Technical University Munich*), disponível em <http://www.gene-quantification.de/download.html> para comparar a diferença de expressão de cada gene alvo entre os grupos. Este modelo tem a vantagem de não assumir nenhum tipo de distribuição e de se adequar aos dados cuja variância pode ser grande, quando não é possível a aplicação de testes paramétricos.

O *software* REST<sup>®</sup> foi desenvolvido com base em testes de permutação, que consideram os resultados obtidos a partir de permutações aleatórias dos dados do experimento: a taxa de expressão é calculada para os dados experimentais, assim os dados são permutados repetidamente e a cada permutação é calculado o diferencial da taxa de expressão para cada par de dados e os resultados são comparados aos dados experimentais. No presente estudo foi considerado 2000 permutações, o mínimo recomendado por Pfaffl, Horgan e Dempfle (2002) para a obtenção de boa estimativa do valor de p. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5.7 ESTUDO PILOTO

A coleta de dados da amostra total foi precedida por um estudo piloto e compreendeu as seguintes fases:

- Primeira fase: aperfeiçoamento do instrumento da coleta de dados, teste do prontuário estruturado e treinamento do pesquisador por profissional com experiência nas áreas de Periodontia e Cirurgia.
- 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, para aferição da reprodutibilidade diagnóstica.
- Terceira fase: treinamento e definição da metodologia de PCR em Tempo Real para análise da expressão dos genes *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  e *iNOS* das amostras de tecido gengival obtidas de quatro mulheres identificadas como P1 e P2 (gestantes com bolsa periodontal) e P3 e P4 (não gestantes

sem bolsa periodontal), realizados no Laboratório de Genética Molecular Dr. Mário Luiz Martinez da Embrapa Gado de Leite.

Os resultados do estudo piloto para definição da metodologia de PCR em Tempo Real são apresentados em Apêndice C.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados na forma de artigo científico intitulado “*Expression of IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , and iNOS in pregnant women with periodontal disease*”, aceito para publicação na revista GMR – *Genetics and Molecular Research*, em 12/06/2012 (Anexo C). O manuscrito foi redigido segundo as normas do periódico (Anexo D).

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



## 7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia utilizada e análise dos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- Não houve diferença na expressão gênica de *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  e *iNOS* entre gestantes com e sem doença periodontal, entre gestantes e não gestantes com doença periodontal, entre gestantes e não gestantes sem doença periodontal.
- Não houve diferença na expressão gênica de *IL-6* e *iNOS* entre não gestantes com e sem doença periodontal.
- A expressão gênica de *IL-1 $\beta$*  em não gestantes com doença periodontal foi significativamente maior que a expressão destas citocinas em não gestantes sem doença.
- A expressão gênica de *TNF- $\alpha$*  em não gestantes com doença periodontal foi significativamente menor que a expressão destas citocinas em não gestantes sem doença.
- A gestação exerce pouca ou nenhuma influência sobre o nível de expressão destes genes associados à doença periodontal.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; SHIV, P. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2008. 564 p.

AGUEDA, A. et al., Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes: a prospective cohort study. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 35, n. 1, p. 16-22, Jan. 2008.

ALBANDAR, J. M.; RAMS, T. E. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. **Periodontol 2000**, Copenhagen, v. 29, n. 1, p. 7-10, July 2002.

ALEXANDER, M. B.; DAMOULIS, P. D. The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. **Curr Opin Periodontol**, Philadelphia, v. 3, p. 39-53, 1994.

ALVES, R. T.; RIBEIRO, R. A.; COSTA, L. R. R. S. Associação entre doença periodontal em gestantes e nascimentos prematuros e/ou de baixo peso: um estudo de revisão. **HU Rev**, Juiz de Fora, v. 33, n. 1, p. 29-36, jan./mar. 2007.

ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol**, Chicago, v. 4, n. 1, p. 1-6, Dec. 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE PESQUISA – ABEP. **Critério de Classificação Econômica Brasil**. 2003. Disponível em: <[http://www.abep.org/codigosguia/ABEP\\_CCEB.pdf](http://www.abep.org/codigosguia/ABEP_CCEB.pdf)> Acesso em: 27 set. 2011.

BARILLI, A. L. A. **Prevalência das doenças periodontais em pacientes com doença isquêmica coronariana aterosclerótica, em Hospital Universitário**. 2003. 117 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

BARROS, B. M.; MOLITERNO, L. F. M. Seria a doença periodontal um novo fator de risco para o nascimento de bebês prematuros com baixo peso? **Rev Bras Odontol**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 4, p. 256-260, jul./ago. 2001.

BASSANI, D.; LUNARDELLI, A. N. Condições periodontais. In: ANTUNES, J. L.F.; PERES, M. A. **Epidemiologia da saúde bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006, p. 60-82.

BATISTA, A. C. et al. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. **Oral Dis**, Malden, v. 8, n. 5, p. 254-260, Sep. 2002.

BERTOLINI, P. F. R. et al. Medicina periodontal e a mulher: a importância do seu conhecimento para uma abordagem preventiva por ginecologistas/obstetras e cirurgiões-dentistas. **Rev Ciênc Méd**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 175-185, maio/jun. 2007.

BICKEL, M. et al. Cytokine gene expression in chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 28, n. 9, p. 840-847, Sep. 2001.

BOBETSIS, Y. A.; BARROS, S. P.; OFFENBACHER, S. Exploring the relationship between periodontal disease and pregnancy complications. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 137, Suppl. 10, p. 7S-13S, Oct. 2006.

BOGGESS, K. A. et al. Maternal periodontal disease in early pregnancy and risk for a small-for-gestational-age infant. **Am J Obstet Gynecol**, New York, v. 194, n. 5, p. 127-141, May 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.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. **Projeto SB Brasil 2010: Resultados principais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Área técnica de Saúde da Mulher. **Pré-natal e Puerpério: atenção qualificada e humanizada. Manual Técnico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Saúde. Divisão Nacional de Saúde Bucal. **Levantamento epidemiológico em saúde bucal: Brasil, zona urbana, 1986**. Brasília: Centro de documentação do Ministério da Saúde, 1988.

BRUNETTI, M. C. **A infecção periodontal associada ao parto pré-termo e de baixo peso ao nascer**. Tese (Doutorado). 2002. 121 f. – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2002.

CAMARGO, E. C.; SOIBELMAN, M. Prevalência da doença periodontal na gravidez e sua influência na saúde do recém-nascido. **Revista AMRIGS**, Porto Alegre, v. 49, n. 1, p. 11-15, jan./mar. 2005.

CARRILLO-DE-ALBORNOZ, A. et al. Gingival changes during pregnancy: III. Impact of clinical, microbiological, immunological and socio-demographic factors on gingival inflammation. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 39, n. 3, p. 272-283, Mar. 2012.

CHAZAN, F.; AQUINO, M. A.; MARIANI NETO, C. Doença periodontal e prematuridade. **Femina**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p. 219-222, abr. 2004.

CHIAPINOTTO, G. A. Etiologia e prevenção da doença periodontal. In: PINTO, V. G. **Saúde bucal coletiva**. 4. ed. São Paulo: Santos, 2000. p. 429-444.

COHEN, D. W. et al. A longitudinal investigation of the periodontal changes during pregnancy. **J Periodontol**, Indianapolis, v. 40, n. 10, p. 563-570, Oct. 1969.

CONTRERAS, A. et al. Periodontitis is associated with preeclampsia in pregnant women. **J Periodontol**, Indianapolis, v. 77, n. 2, p. 182-188, Feb. 2006.

COSTA, F. S. et al. Óxido nítrico e peptídeo atrial natriurético na predição de complicações da gestação. **Rev Bras Ginecol Obstet**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 41-47, jan. 2007.

COTRAN, R. S. et al. Inflamação e reparação. In: ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. 327 p.

DAMARE, S. M.; WELLS, S.; OFFENBACHER, S. Eicosanoids in periodontal diseases: potencial for systemic involvement. **Adv Exp Med Biol**, New York, v. 433, n. 2, p. 23-35, Aug. 1997.

DANTAS, E. M. et al. Doença periodontal como fator de risco para complicações na gravidez - há evidência científica? **Odontol Clin Cient**, Recife, v. 3, n. 1, p. 07-10, jan./abr. 2004.

DARVEAU, R. P.; TANNER, A.; PAGE, R. C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontol 2000**, Copenhagen, v. 14, n. 1, p. 12-32, June 1997.

DASANAYAKE, A. P. Poor periodontal health of the pregnant woman as a risk factor for low birth weight. **Ann Periodontol**, Chicago, v. 3, n. 1, p. 212-216, July 1998.

DASHASH, M. et al. Interleukin-6-174 genotype, periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: A Pilot Study. **J Clin Immunol**, New York, v. 28, p. 237-243, May 2008.

DAVENPORT, E. S. et al. Maternal periodontal disease and preterm low birthweight: case-control study. **J Dent Res**, Washington, v. 81, n. 5, p. 313-318, May 2002.

DAVENPORT, E. S. et al. The East London study of maternal chronic periodontal disease and preterm low birth weight infants: study design and prevalence data. **Ann Periodontol**, Chicago, v. 3, n. 1, p. 206-212, July 1998.

DINARELLO, C. A. Biological basis for interleukin-1 disease. **Blood**, Washington, v. 87, n. 4, p. 2095-2147, Feb. 1996.

DUSSE, L. M. S.; VIERIA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre oxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, maio 2003.

EJEIL, A. L. et al. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? **J. Periodontol**, Indianápolis, v. 74, n. 2, p. 196-201, Feb. 2003.

FAIZUDDIN, M.; BHARATHI, S. H.; ROHINI, N. V. Estimation of interleukin-1b levels in the gingival crevicular fluid in health and in inflammatory periodontal disease. **J Periodont Res**, Copenhagen, v. 38, n. 2, p. 111-114, Apr. 2003.

FERGUSON, J. E. et al. Should we treat periodontal disease during gestation to improve pregnancy outcomes? **Clin Obstet Gynecol**, Hagerstown, v. 50, n. 2, p. 454-467, June 2007.

FERREIRA, A. P.; TEIXIERA, H. C. **Tópicos de imunologia básica**. Juiz de Fora: Ed. UFJF. 2005. 74 p.

FIGUERO, E. et al. Gingival changes during pregnancy: I. Influence of hormonal variations on clinical and immunological parameters. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 37, n. 3, p. 220-229, Mar. 2010.

FLEMING, T. F. Periodontitis. **Ann Periodontol**, Chicago, v. 4, n. 1, p. 32-37, Dec. 1999.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 265-271, jul./set. 2000.

GAFFIELD, M. L. et al. Oral health during pregnancy: an analysis of information collected by the pregnancy risk assessment monitoring system. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 132, n. 7, p. 1009-1016, July 2001.

GOMES FILHO, I. S. et al. Comparação de critérios que determinam o diagnóstico clínico da doença periodontal. **Rev Odonto Ciênc**, Porto Alegre, v. 21, n. 51, p. 77-81, jan./mar. 2006.

GÜNCÜ, G. N.; TÖZÜM, T. F.; CAGLAYAN, F. Effects of endogenous sex hormones on the periodontium - review of literature. **Aust Dent J**, Sydney, v. 50, n. 3, p. 138-145, Sept. 2005.

GÜRSOY, M. et al. Clinical changes in periodontium during pregnancy and post-partum. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 35, n. 7, p. 576-583, July 2008.

GÜRSOY, M. et al. Does the frequency of *Prevotella intermedia* increase during pregnancy? **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 24, n.4, p. 299-303, Aug. 2009.

HIROSE, M. et. al. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. **J Periodontol**, Indianapolis, v. 72, n. 5, p. 590-597, May 2001.

JEFFCOAT, M. K. et al. Periodontal infection and preterm birth: results of a prospective study. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 137, n. 7, p. 875-880, July 2001.

JESEN, J.; LILJEMARK, W.; BLOOMQUIST, C. The effect of female sex hormones on subgingival plaque. **J Periodontol**, Indianapolis, v. 52, n. 10, p. 599-602, Oct. 1981.

KATZ, J. et al. Oral health and preterm delivery education: a new role for the pediatric dentist. **Pediatr Dent**, Chicago, v. 28, n. 6, p. 494-498, Nov./Dec. 2006.

KENDALL, H. K. et al. Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. **J Periodont Res**, Copenhagen, v. 35, n. 4, p. 194-200, Aug. 2000.

KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. L.; BARTOLD, P. M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Dis**, Malden, v. 7, n. 1, p. 2-10, Jan. 2001.

KINANE, D. F. Causations and pathogenesis of periodontal disease. **Periodontol 2000**, Copenhagen, v. 25, n. 1, p. 8-20, Feb. 2001.

KINANE, D. F.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Patogênese da periodontite . In: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 271-291.

KLEBANOFF, M.; SEARLE, K. The role of inflammation in preterm birth-focus on periodontitis. **BJOG**. Oxford, v. 113, Suppl. 3, p. 43-45, Dec. 2006.

KORNMAN, K. S.; LOESCHE, W. J. The subgingival microbial flora during pregnancy. **J Periodont Res**, Copenhagen, v. 15, n. 2, p. 111-122, Mar. 1980.

KORNMAN, K. S.; LOESCHE, W. J. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melanogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. **Infect Immun**, Washington, v. 35, n. 1, p. 256-263, Jan. 1982.

LAINÉ, M. A. Effect of pregnancy on periodontal and dental health. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v. 60, n. 5, p. 257-264, Oct. 2002.

LAPPIN, D. F. et al. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. **J Periodont Res**, Copenhagen, v. 35, n. 6, p. 369-373, Dec. 2000.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2010. 1304 p.

LÖE, H. Periodontal changes in pregnancy. **J Periodontol**, Indianapolis, v. 36, p. 209-217, May/June 1965.

LÖE, H.; SILNESS, J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v. 21, n. 6, p. 533-551, Dec. 1963.

LÖE, H. et al. Natural history of periodontal disease in man: rapid, moderate and no loss of attachment in Sri-Lankan laborers 14 to 46 years of age. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 13, n. 5, p. 431-440, May 1986.

LOESCHE, W. J. Association of the oral flora with important medical diseases. **Curr Opin Perodontol**, Philadelphia, v. 4, p. 21-28, 1997.

LOPATIN, D. E.; KORNMAN, K. S.; LOESCHE, W. J. Modulation of immunoreactivity to periodontal disease-associated microorganisms during pregnancy. **Infect Immun**, Washington, v. 28, n. 3, p. 713-718, June 1980.

LÓPEZ, N. J.; SMITH, P. C.; GUTERREZ, J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. **J Periodontol**, Indianapolis, v. 73, n. 8, p. 911-924, Aug. 2002a.

LÓPEZ, N. J.; SMITH, P. C.; GUTERREZ, J. Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. **J Dent Res**, Chicago, v. 81, n. 1, p. 58-63, Jan. 2002b.

LOURO, P. M.; FIORI, H. Doença periodontal na gravidez e baixo peso ao nascer. **J Ped**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 1, p. 23-28, jan./fev. 2001.

MACHUCA, G. et al. The influence of general health and socio-cultural variables on the periodontal condition of pregnant women. **J Periodontol**, Indianapolis, v. 70, n. 7, p. 779-785, July 1999.

MANAU, C. et al. Periodontal disease definition may determine the association between periodontitis and pregnancy outcomes. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 35, n. 1, p. 385-397, May 2008.

MATEJKA, M. et al. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. **J Periodont Res**, Copenhagen, v. 33, n. 8, p. 517-518, Nov. 1998.

McCANN, A. L.; BONCI, L. Maintaining women's oral health. **Dent Clin North AM**, Philadelphia, v. 45, n. 3, p. 571-601, Mar. 2001.



MEDEIROS, U. V.; CARVALHO, J. C. C. Estudo sobre as condições da saúde bucal da população – Programa comunitário de atenção periodontal. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 165-170, jan. 1990.

MILLER, G. S. et al. Salivary biomarkers of existing periodontal disease / A cross-sectional study. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 137, n. 3, p. 322-29, Mar. 2006.

MOKEEM, S. A.; MOLLA, G. N.; AL-JEWAIR, T. S. The prevalence and relationship between periodontal disease and pre-term low birth weight infants at King Khalid University Hospital in Riyadh, Saudi Arabia. **J Contemp Dent Pract**, Cincinnati, v. 5, n. 2, p. 40-56, May 2004.

MURAMATSU, Y.; TAKAESU, Y. Oral health status related to subgingival bacterial flora and sex hormones in saliva during pregnancy. **Bull Tokyo Dent Coll**, Tóquio, v. 35, n. 3, p. 139-151, Aug. 1994.

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

NICOLAU, G. V.; RAPOPORT, A.; SELSKI, M. A. S. Dosagem de interleucina 1 $\beta$  na doença periodontal. **Rev Bras Otorrinolaringol**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 186-91, mar./abr. 2003.

NOACK, B. et al. Periodontal status and preterm low birth weight: a case control study. **J Periodontol**, Indianapolis, v. 40, n. 4, p. 339-345, Mar. 2005.

OFFENBACHER, S. et al. Effects of periodontal thereapy during pregnancy on periodontal status, biologic parameters, and pregnancy outcomes: a pilot study. **J Periodontol**, Indianápolis, v. 77, n. 12, p. 2011-2024, Dec. 2006.

OFFENBACHER, S. et al. Maternal periodontitis and prematurity. Part I: Obstetric outcome of prematurity and growth restriction. **Ann Periodontol**, 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. **J Periodontol**, Indianapolis, v. 67, n. 10, p. 1103-1113, Oct. 1996.

OFFENBACHER, S. et al. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis-associated pregnancy complications. **Ann Periodontol**. Chicago, v. 3, n. 1, p. 233-250, July 1998b.

OFFENBACHER, S. et al. Role of periodontitis in systemic health: spontaneous preterm birth. **J Dent Educ**, Washington, v. 62, n. 10, p. 852-858, Oct. 1998a.

OLIVEIRA, A. G. R. C. Levantamentos epidemiológicos em saúde bucal no Brasil. In: ANTUNES, J. L.F.; PERES, M. A. **Epidemiologia da saúde bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 32-48.

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. 144 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Universidade Federal de Juiz de Fora/MG, 2009.

PAN, Z. et al. Nitric oxide synthase in gingival tissues of patients with chronic periodontitis and with and without diabetes. **J Periodontol**, Indianapolis, v. 81, n. 1, p. 109-120, Jan. 2010.

PAPAPANOU, P. N.; LINDHE, J. Epidemiologia das doenças periodontais. In: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 123-170.

PASSANEZI, E.; BRUNETTI, M. C.; SANT'ANA, A. C. P. Interação entre a doença periodontal e a gravidez. **Periodontia**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 32-38, jun. 2007.

PFAFFL, M. W. Relative quantification. In: DORAK, M. T. **Real-Time PCR**. Taylor e Francis Group, 2006. p. 63-82.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool REST<sup>®</sup>) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 1-10, Mar. 2002.

RAMOS, T. M. et al. Condições bucais e hábitos de higiene bucal em gestantes de baixo nível socioeconômico no Município de Aracaju - SE. **Pesq Bras Odontoped Clín Integr**, João Pessoa, v. 6, n. 3, p. 229-235, set./dez. 2006.

ROMANO, M. et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. **Immunity**, Cambridge, v. 6, n. 3, p. 315-325, Mar. 1997.

ROMERO, B. C. et al. Relationship between periodontal disease in pregnant women and the nutritional condition of their newborns. **J Periodontol**, Indianapolis, v. 73, n. 10, p. 1177-1183, Oct. 2002.

ROSELL, F. L.; MONTANDON-POMPEU, A. A. B.; VALSECKI JR., A. Registro periodontal simplificado em gestantes. **Rev Saúde Publ**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 157-162, mar./abr. 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3 ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p.

SANTANA, F. C. M. et al. A doença periodontal como fator de risco em gestantes com bebês prematuros de baixo peso ao nascer. **Pesq Bras Odontoped Clín Integr**, João Pessoa, v. 5, n. 3, p. 247-252, set./dez. 2005.

SANTOS, C. F. et al. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v. 12, n. 1, p. 1-11, jan./mar. 2004.

SARTÓRIO, M. L.; MACHADO, W. A. S. A doença periodontal na gravidez. **Rev Bras Odontol**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 5, p. 306-308, set./out. 2001.

STOIKA, R. et al. A. In vitro response of phagocytic cells to immunomodulating agents. **Med Sci Monit**, Warsaw, v. 7, n. 4, p. 652-658, Jul./Aug. 2001.

TENG, Y. T. Protective and destructive immunity in the periodontium: Part 1 - Innate and humoral immunity and the periodontium. **J Dent Res**, Washington, v. 85, n. 3, p. 198-208, Mar. 2006.

TILAKARATNE, A. et al. Periodontal disease status during pregnancy and 3 months post-partum, in a rural population of Sri-Lankan women. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 27, n. 10, p. 787-792, Oct. 2000.

TOBÓN-ARROYAVE, S. I.; JARAMILLO-GONZÁLEZ, P. E.; ISAZA-GUZMÁN, D. M. Correlation between salivary IL-1b levels and periodontal clinical status. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 53, n. 4, p. 346-352, Apr. 2008.

UGAR-CANÇAL, D.; OZMERIC, N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, v. 366, n. 1-2, p. 90-100, Apr. 2006.

VETTORE, M. V. et al. The relationship between periodontitis and preterm low birthweight. **J Dent Res**, Chicago, v. 87, n. 1, p. 73-78, Jan. 2008.

VOGT, M. **Doença periodontal e resultados perinatais adversos em uma coorte de gestantes**. 2006. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Piracicaba Odontologia Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2006.

WILLIAMS, C .E. C. S.; OFFENBACHER, S. Periodontol medicine: the emergence of a new branch of periodontology. **Periodontol 2000**, Copenhagen, v. 23, n. 1, p. 9-12, June 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Oral Heath Surveys: Basic Methods**. 4. ed. GENEVA: World Health Organization. 1997.

XAVIER, H. S.; XAVIER, V. B. C. **Cuidados odontológicos com a gestante**. São Paulo: Santos, 2004. 114 p.

XIONG, X. et al. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: a systematic review. **BJOG**, Oxford, v. 1, n. 113, p. 135-143, Feb. 2006.

YEN BEE NG, P. et al. Candidate salivary biomarker associated with alveolar bone loss: cross-sectional and in vitro studies. **FEMS Immunol Med Microbial**, Amsterdam, v. 49, p. 252-60, 2007.

YALCIN, F. et al. The effects of periodontal therapy on intracrevicular prostaglandin E<sub>2</sub> concentrations and clinical parameters in pregnancy. **J Periodontol**, v. 73, n. 2, p. 173-177, Feb. 2002.

YOKOYAMA, M. et al. Relationship between Campylobacter rectus and periodontal status during pregnancy. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 23, n.1, p. 55-59, Feb. 2008.

## **APÊNDICES**

<b>APÊNDICE A</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>APÊNDICE B</b>	Prontuário estruturado
<b>APÊNDICE C</b>	Resultados do Estudo Piloto

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Consentimento pós-informação para participação em Projeto de Pesquisa em duas vias: uma para o(a) Voluntário (a) e outra para a Pesquisadora Responsável.

Estas são fornecidas pela Pesquisadora Responsável *Cristiane Corsini Medeiros Otenio*, com o objetivo de firmar acordo por escrito mediante o qual a voluntária da pesquisa, aceita participar do estudo, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação. 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 Comitê de Ética em Pesquisa da UFJF pelo telefone 3229-3788.

### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

**1. Título preliminar do estudo: “Doença Periodontal em Gestantes – expressão gênica de citocinas inflamatórias e - óxido nítrico”.**

#### **2. Pesquisadora responsável:**

- Cristiane Corsini Medeiros Otenio – Cirurgiã-dentista, Odontopediatra, Doutoranda em Saúde Brasileira pela Universidade Federal de Juiz de Fora – MG.
- Contatos: (32) 3236-2998 ou (32) 9117-9322.

#### **Pesquisadora participante:**

- Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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. Justificativa:** Considerando a evidência de que a progressão da doença periodontal pode contribuir para um desfecho adverso da gestação, avaliar a expressão gênica dos mediadores químicos pró-inflamatórios e óxido nítrico se

justifica. Este projeto permitirá a obtenção de dados para um melhor diagnóstico da doença, subsidiando, desta forma, a instituição de programas que visem à manutenção da saúde periodontal desse grupo populacional.

**4. Objetivo:** Estudar a doença periodontal em gestantes (atendidas pelo Projeto Só-Riso/Atenção Materno-Infantil, Projeto de Extensão da Faculdade de Odontologia), e em não gestantes (oriundas das clínicas das Disciplinas de Cirurgia e Periodontia) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora por meio da determinação da expressão gênica de citocinas inflamatórias e óxido nítrico.

**5. Procedimentos:** Se você resolver participar, você deverá responder a uma entrevista que será realizada pela pesquisadora responsável; submeter-se a um exame clínico de rotina, e à coleta de amostra de tecido gengival.

**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 do tecido gengival. Todavia garanto que você não será identificada por meio do formulário preenchido.

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

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

**8. Informações adicionais:** você tem a garantia de que receberá respostas às suas perguntas e esclarecimentos das dúvidas sobre o estudo sempre que preciso. Além disso, não será identificada na publicação do artigo científico em revista especializada e tem liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo.

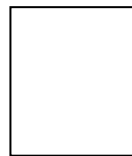
**9. Consentimento livre e esclarecido:**

Eu, \_\_\_\_\_, RG/CPF \_\_\_\_\_, certifico que, tendo lido as informações prévias e tendo sido suficientemente esclarecido (a) pela Pesquisadora Responsável sobre todos estes itens acima, estou de acordo com a realização do estudo, autorizando minha participação como voluntária.

Juiz de Fora, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

---

Assinatura da voluntária



Assinatura Dactiloscópica

---

Cristiane Corsini Medeiros Otenio  
Pesquisadora responsável



## APÊNDICE B – Prontuário Estruturado

### 1 DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

DATA DO EXAME: \_\_\_\_\_ SEMANA GESTACIONAL: \_\_\_\_\_

NOME: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

TELEFONE: \_\_\_\_\_

### 2 DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS

1.1 Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos

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

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

1.5 Trabalha fora de casa? ( ) sim     ( ) não

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/tanquinho ( ) sim                      ( ) não  
 Videocassete/DVD                    ( ) sim                      ( ) não  
 Geladeira                                ( ) sim                      ( ) não

### **3 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 parto complicado? ( ) sim                      ( ) não

2.5 Perdeu algum bebê? ( ) sim    ( ) não

2.6 Esta gestação foi acompanhada pelo médico? ( ) sim                      ( ) não

2.7 Quantos exames pré-natais você fez? \_\_\_\_\_

2.8 Teve algum problema de saúde durante a gestação? ( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

2.9 Tomou algum medicamento? ( ) sim    ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

2.10 Tem história de hipertensão? ( ) sim                      ( ) não

2.11 É diabética? ( ) sim    ( ) não Que tipo? \_\_\_\_\_

2.12 Teve anemia? ( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

2.13 Já teve infecção urinária? ( ) sim ( ) não Quando? \_\_\_\_\_

2.14 Já teve alguma doença sexualmente transmissível? Qual? \_\_\_\_\_

2.15 Fuma? ( ) sim ( ) não Quantos cigarros por dia? \_\_\_\_\_

2.16 Parou de fumar durante a gestação? ( ) sim    ( ) não Quando? \_\_\_\_\_

- 2.17 Bebe? ( ) sim ( ) não Quantas vezes por semana? \_\_\_\_\_
- 2.18 Parou de beber durante a gestação? ( ) sim ( ) não Quando? \_\_\_\_\_
- 2.19 Fez uso de outra droga no período gestacional? ( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_
- 2.20 Faz acompanhamento odontológico na gestação? ( ) sim ( ) não Por quê? \_\_\_\_\_
- 2.21 Realiza algum tipo de tratamento odontológico? ( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_
- 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 Teve muitas náuseas na gestação? ( ) sim ( ) não
- 2.28 Sua gengiva sangra na hora da higiene bucal? ( ) sim ( ) não
- 2.29 Sempre sangrou ou somente após a gravidez? \_\_\_\_\_

#### **4 CONDIÇÃO PERIODONTAL**

<b>Região</b>	<b>Superior direita</b>							<b>Superior esquerda</b>						
Elemento	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
CPI														
NIC														
SS														
<b>Região</b>	<b>Inferior direita</b>							<b>Inferior esquerda</b>						
Elemento	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
CPI														
NIC														
SS														

### APÊNDICE C – Resultados do estudo piloto

A Tabela 1 mostra a quantificação de RNA Total extraído das amostras do estudo piloto (P1, P2, P3 e P4), divididos em dois grupos: com bolsa periodontal (CB) e sem bolsa periodontal (SB). Observa-se uma variação na concentração de RNA (ng/ $\mu$ L) que pode ter ocorrido pela quantidade de tecido gengival utilizado na extração (aproximadamente de 30 a 70 mg), pela composição do tecido ou pela incompleta homogeneização da amostra. Contudo a razão de  $A_{260/280}$  das amostras ficaram entorno 2,1, sendo esta utilizada para verificar a pureza de RNA. Se valores diferentes destes forem encontrados, há a indicação da presença de impurezas na preparação. Se for menor que 2,0, indica a presença de proteínas, enquanto valores maiores indicam presença de fenol ou outros contaminantes que são absorvidos em grande quantidade ou próximo de 260 nm (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Tabela 1 – Quantificação do RNA Total das amostras P1, P2, P3 e P4 de tecido periodontal.

Amostra	Data da Extração	ng/ $\mu$ L	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	$A_{230}$	Grupo
P1	28/09/2009	766,1	19,2	9,2	2,1	1,1	18	CB
P2	28/09/2009	494,2	12,4	5,9	2,1	1,7	7	CB
P3	28/09/2009	88,0	2,2	1,1	2,1	1,1	2	SB
P4	28/09/2009	299,4	7,5	3,6	2,1	1,5	5	SB

Na Tabela 2 pode ser observado a quantificação de cDNA que é sintetizado a partir do mRNA utilizando-se o *SuperScript. III First-Strand Synthesis System for RT-PC* (Invitrogen).

Tabela 2 – Quantificação do cDNA das amostras P1, P2, P3 e P4 de tecido periodontal.

Amostra	Data da Síntese	ng/ $\mu$ L	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260/280}$	$260/230$	$A_{230}$	Grupo
P1	29/09/2009	893,0	27,1	16,5	1,6	1,7	16	CB
P2	29/09/2009	871,4	26,4	16,3	1,6	1,9	14	CB
P3	29/09/2009	751,7	22,8	14,5	1,6	1,9	12	SB
P4	29/09/2009	803,7	24,4	15,1	1,6	2,0	12	SB

Para cada gene (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *iNOS*,  *$\beta$ -actina* e *GAPDH*) foram avaliadas as curvas de amplificação e dissociação. As Figuras 1 e 2 mostram que

para o gene *IL-1 $\beta$*  não houve amplificação e por isto não foi observado nenhum pico na curva de dissociação.



Figura 1 – Curva de amplificação do gene *IL-1 $\beta$*  gerada pelo 7300 Real Time PCR System.

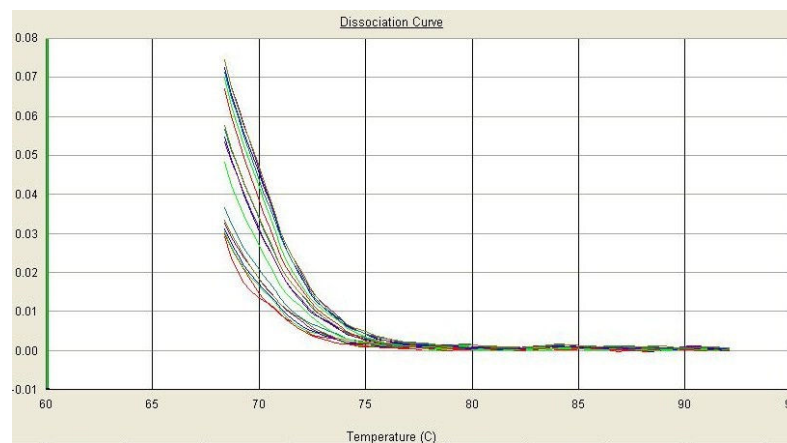


Figura 2 – Curva de dissociação do gene *IL-1 $\beta$*  gerada pelo 7300 Real Time PCR System.

Nas Figuras 3 e 5 observa-se a curva de amplificação dos genes *IL-6* e *iNOS*. Por outro lado nas Figuras 4 e 6 observa-se na curva de dissociação dos referidos genes a presença de mais de um pico. A presença de dois ou mais picos na curva de dissociação indica que não houve amplificação somente do produto específico, ou seja, do gene em estudo ou, ainda, a concentrações de molde e *primer* precisam ser otimizadas na reação.

Nas Figuras 3 e 5 observa-se a curva de amplificação dos genes *IL-6* e *iNOS*. Por outro lado, nas Figuras 4 e 6 observa-se na curva de dissociação dos referidos genes a presença de mais de um pico. A presença de dois ou mais picos na curva de dissociação indica que não houve amplificação somente do produto específico, ou seja, do gene em estudo ou, ainda que, a concentrações de molde e *primer* precisam ser otimizadas na reação.

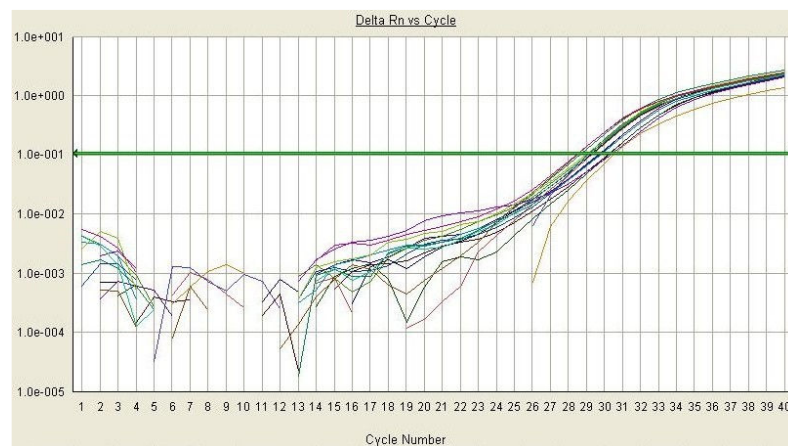


Figura 3 – Curva de amplificação do gene *IL-6* gerada pelo 7300 Real Time PCR System.

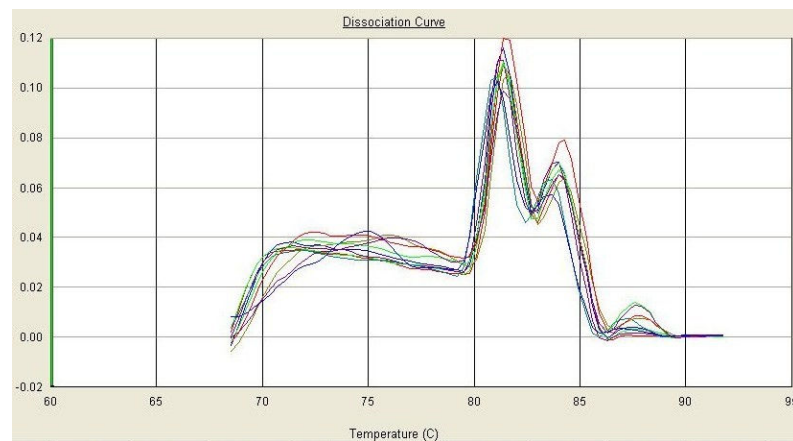


Figura 4 – Curva de dissociação do gene *IL-6* gerada pelo 7300 Real Time PCR System.



Figura 5 – Curva de amplificação do gene *iNOS* gerada pelo *7300 Real Time PCR System*.

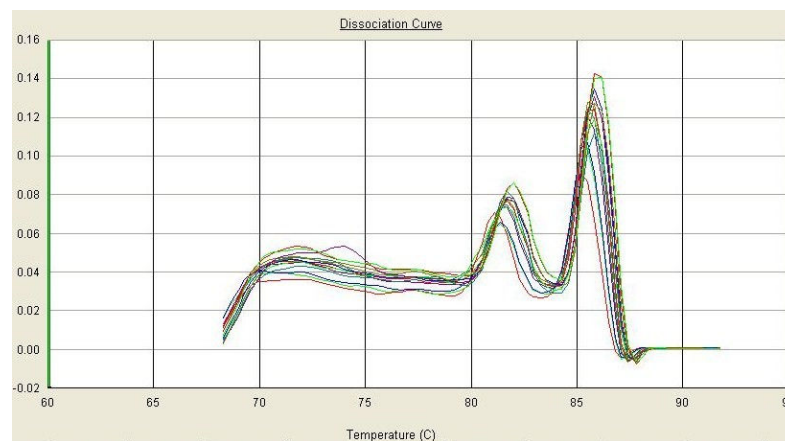


Figura 6 – Curva de dissociação do gene *iNOS* gerada pelo *7300 Real Time PCR System*.

Na curva de amplificação do gene *IL-1 $\beta$*  gerada pelo *7300 Real Time PCR System* não houve a amplificação e na curva de dissociação dos genes *IL-6* e *iNOS* ocorreu a presença de mais de um pico para estes genes, o que não corrobora com Hirose et al. (2001), novos *primers* foram desenhados e foram testados posteriormente. Para o desenho dos novos *primers* foi utilizado o programa *Primer Express* versão 3.0 (Applied Biosystems), conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Sequência dos novos *primers* utilizados para avaliar a expressão dos genes *IL-1 $\beta$* , *IL-6* e *iNOS*.

<b>Primer</b>		<b>Sequência</b>	<b>Referência ou ID*</b>
<i>IL-1 <math>\beta</math></i>	F	GCACGATGCACCTGTACGAT	BC008678 1
	R	AGACATCACCAAGCTTTTTTGTCT	
<i>IL-6</i>	F	CCAGGAGCCCAGCTATGAAC	AK301141.1
	R	GAGCAGCCCCAGGGAGAA	
<i>iNOS</i>	F	CCTCGGCTCCAGCATGTAC	NM_002046
	R	TGGGACAGCTTCTGATCAATG	

\*ID no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Nas Figuras 7, 8 e 9, observa-se a curva de amplificação do gene *TNF- $\alpha$*  e dos controles endógenos  *$\beta$ -actina* e *GAPDH*. As Figuras 10, 11 e 12 mostram que, durante a curva de dissociação, não foram observados picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos não específicos para o gene alvo e para os controles endógenos.

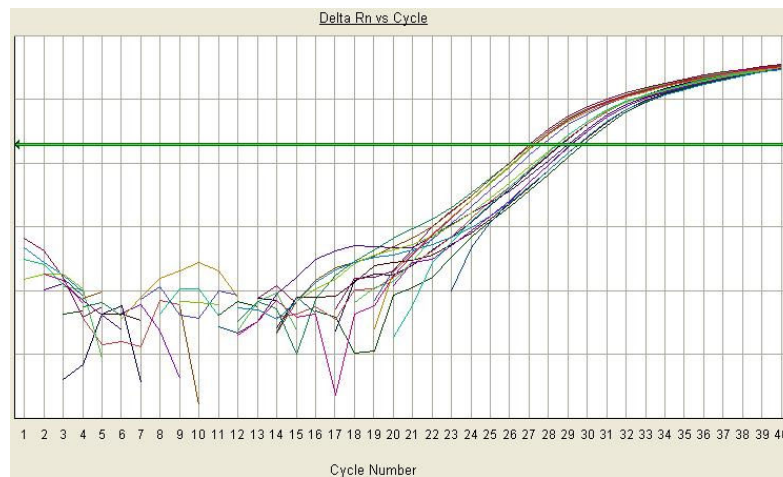


Figura 7 – Curva de amplificação do gene *TNF- $\alpha$*  gerada pelo *7300 Real Time PCR System*.



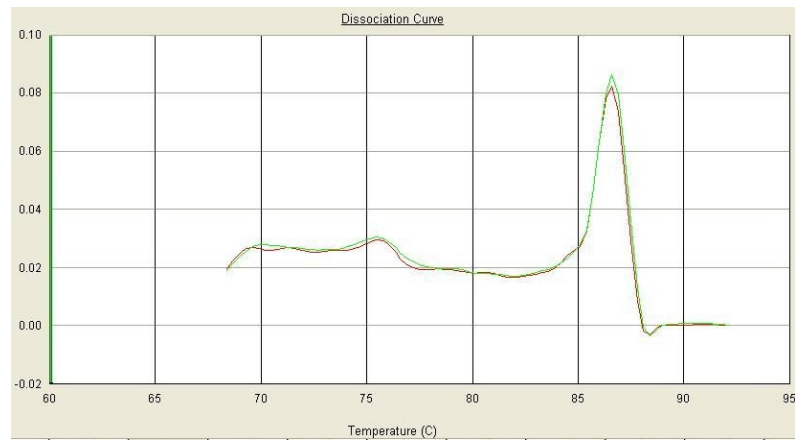


Figura 8 – Curva de dissociação do gene *TNF- $\alpha$*  gerada pelo 7300 Real Time PCR System.



Figura 9 – Curva de amplificação do gene  *$\beta$ -actina* gerada pelo 7300 Real Time PCR System.

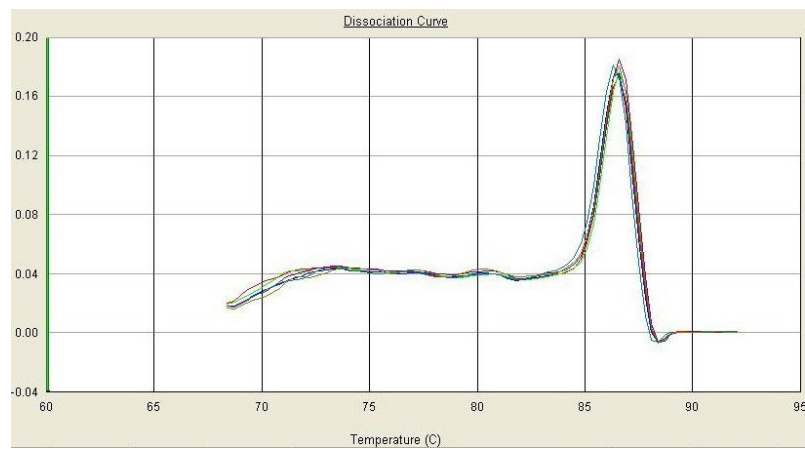


Figura 10 – Curva de dissociação do gene  *$\beta$ -actina* gerada pelo 7300 Real Time PCR System.



Figura 11 – Curva de amplificação do gene *GAPDH* gerada pelo 7300 Real Time PCR System.

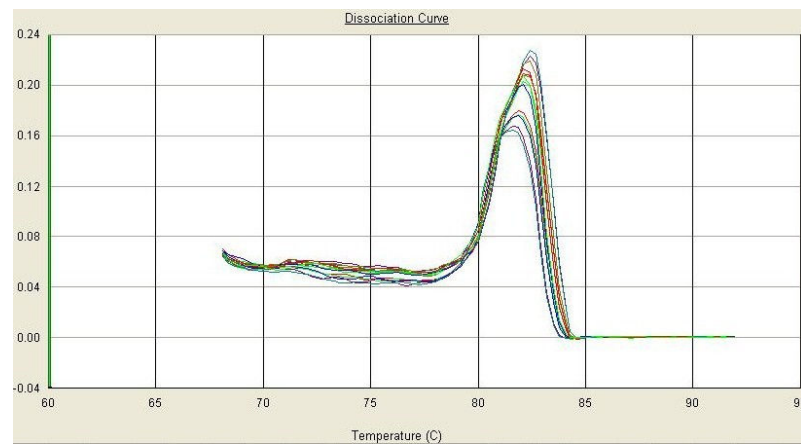


Figura 12 – Curva de dissociação do gene *GAPDH* gerada pelo 7300 Real Time PCR System.

Nas Figuras 13, 14 e 15, observa-se a curva de amplificação dos novos *primers* sintetizados dos genes *IL-1 $\beta$* , *IL-6* e *iNOS*. As Figuras 16, 17 e 18 mostram que, durante a curva de dissociação, não foram observados picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos não específicos para os genes alvo.

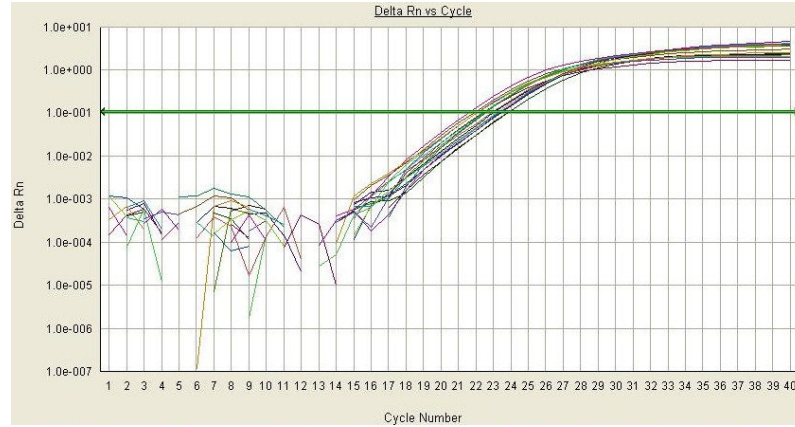


Figura 13 – Curva de amplificação do gene *IL-1 $\beta$*  gerada pelo 7300 Real Time PCR System.

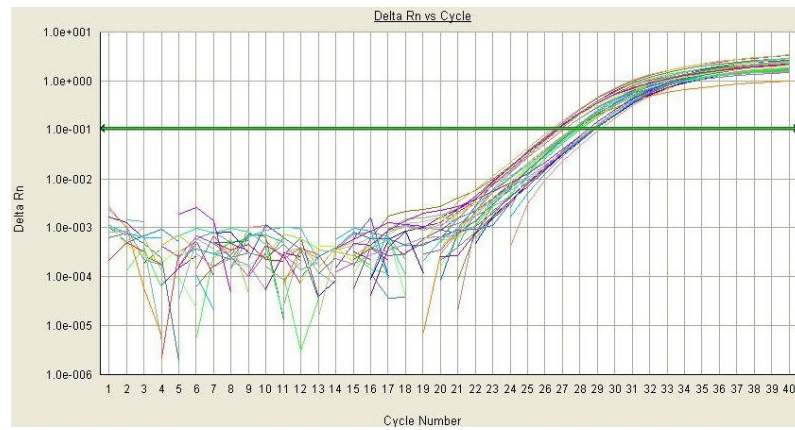


Figura 14 – Curva de amplificação do gene *IL-6* gerada pelo 7300 Real Time PCR System.

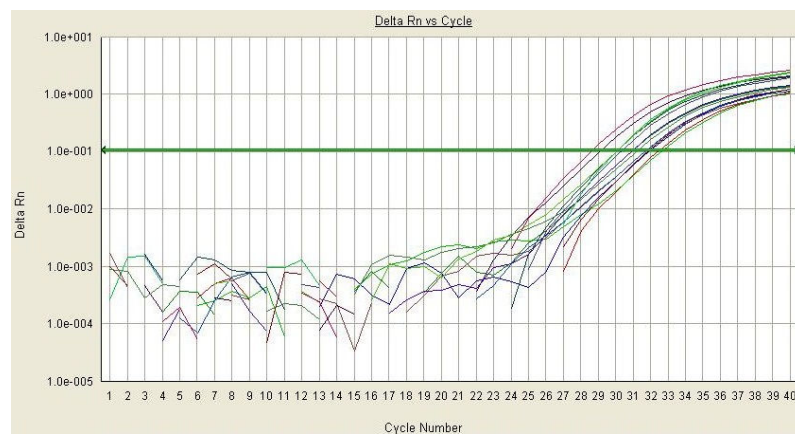


Figura 15 – Curva de amplificação do gene *iNOS* gerada pelo 7300 Real Time PCR System.

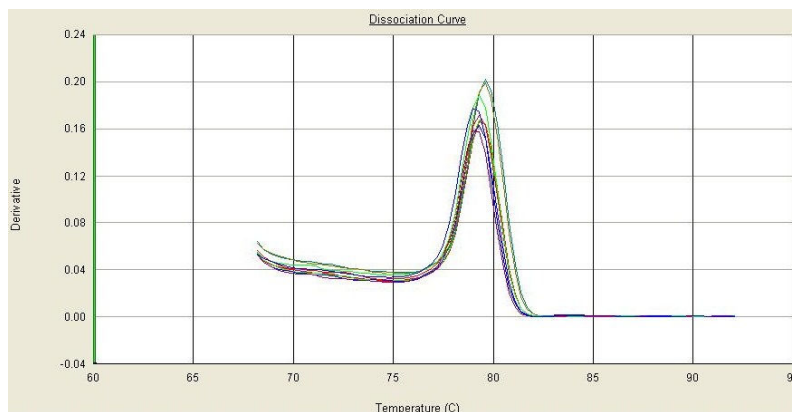


Figura 16 – Curva de dissociação do gene *IL-1 $\beta$*  gerada pelo 7300 Real Time PCR System.

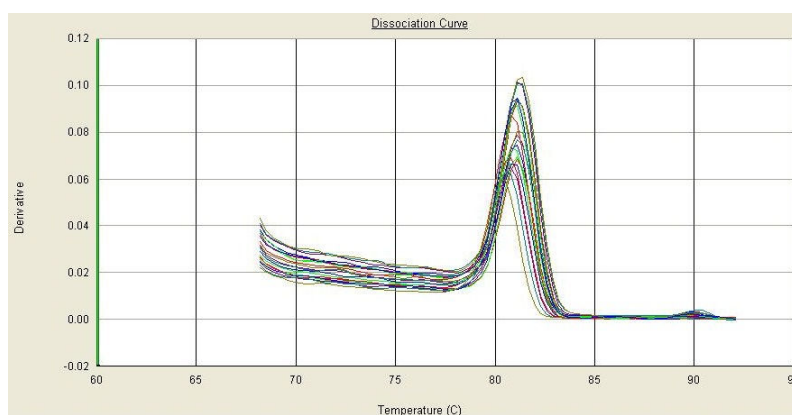


Figura 17 – Curva de dissociação do gene *IL-6* gerada pelo 7300 Real Time PCR System.

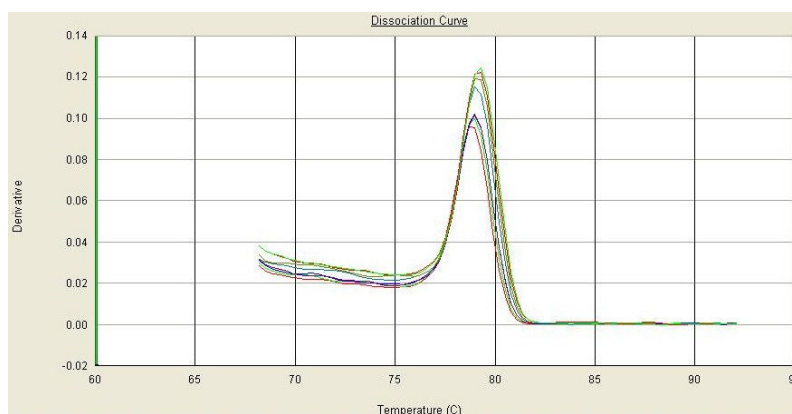


Figura 18 – Curva de dissociação do gene *iNOS* gerada pelo 7300 Real Time PCR System.

Após a coleta de todas as amostras do estudo, foi feito o PCR em Tempo Real. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo programa REST<sup>®</sup> 2009 para comparar a diferença de expressão de cada gene alvo (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$* ,

*iNOS*) em tecido periodontal de gestantes com e sem DP, das não gestantes portadoras e não portadoras.

## ANEXOS

- ANEXO A** Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.
- ANEXO B** Autorização do Laboratório de Genética Molecular Dr. Mário Luiz Martinez da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora.
- ANEXO C** Aceite de publicação do artigo científico intitulado “*Expression of IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , and iNOS in pregnant women with periodontal disease*”, na revista GMR – *Genetics and Molecular Research*.
- ANEXO D** Normas de publicação do periódico GMR – *Genetics and Molecular Research*.
- ANEXO E** Trabalho apresentado sob a forma de pôster no 7º Congresso Odontologia 2010 – Juiz de Fora/MG. Este trabalho refere-se a resultados parciais do estudo piloto.
- ANEXO F** Trabalho apresentado sob a forma de pôster na IADR (*International Association for Dental Research*) 2011 – San Diego/California. Este trabalho refere-se a resultados parciais do estudo piloto.

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.



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 «263/2008»

**Protocolo CEP-UFJF:** 1502.193.2008 **FR:** «204407» **CAAE:** «0163.0.180.000-08»

**Projeto de Pesquisa:** "Doença periodontal em gestantes – determinação da expressão gênica de citocinas inflamatórias e óxido nítrico"

**Pesquisador Responsável:** Cristiane Corsini Medeiros Otenio

**Pesquisadores Participantes:** Rosângela Almeida Ribeiro, Marta Fonseca Martins Guimarães

**Instituição:** Faculdade de Odontologia da UFJF

#### Sumário/comentários

O CEP analisou o projeto e considerou que:

- Uma possível explicação não causal para a correlação entre a doença periodontal e o parto prematuro tem, como hipótese, que indivíduos com predisposição genética poderiam determinar uma resposta hiperinflamatória na presença de um desafio bacteriano. A periodontite avançada poderia ser um marcador de susceptibilidade ao nascimento prematuro e poderia estar ligada a alguma alteração fenotípica em gestantes. Assim, considerando a evidência de que a progressão da doença periodontal pode contribuir para um desfecho adverso da gestação, avaliar a expressão gênica dos mediadores químicos pró-inflamatórios, subsidiará um melhor diagnóstico da doença, desta forma, a instituição de programas que visem à manutenção da saúde periodontal desse grupo populacional.
- O objetivo será estudar a doença periodontal em gestantes, por meio da determinação da expressão gênica de citocinas inflamatórias e óxido nítrico. E como objetivos específicos têm-se a:
  - o Avaliação da expressão mRNA de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) e da enzima óxido nítrico induzível (iNOS) em tecido gengival inflamado de gestantes com DP, em comparação com mulheres não gestantes portadoras de DP.
  - o Análise da relação de dependência da expressão gênica dos biomarcadores (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e NO) com o grau de inflamação do tecido gengival de gestantes com DP, em comparação com mulheres não gestantes portadoras de DP.
- A metodologia consiste no exame físico de dez gestantes atendidas pelo Projeto de Extensão Só-Riso/Atenção Materno-Infantil, encaminhadas pelo Sistema Único da Saúde do município, e por dez mulheres não gestantes, oriundas das clínicas das Disciplinas de Cirurgia e Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. A coleta do tecido será feita a partir de uma biópsia incisional do sítio com maior profundidade da bolsa periodontal, realizada com punch e bisturi com lâmina de aço. O procedimento será sob o efeito de anestesia local, indicada para cirurgia bucal menor. As amostras de tecido gengival, aproximadamente 50mg, serão imediatamente imersas em conservante (RNA later® – Applied Biosystems – Austin – EUA), em microtubos e estocadas a uma temperatura de -20°C para posterior extração de RNA para posterior análise laboratorial
- Critérios de Inclusão: Serão incluídas as mulheres, gestantes e não gestantes portadoras de doença periodontal em bom estado de saúde geral independente de raça, nível socioeconômico ou escolaridade; ser cadastradas no SUS/JF; e que tiverem idade entre 18 e 40 anos.
- Critérios de Exclusão: Serão excluídas as mulheres gestantes e não gestantes que forem portadoras de diabetes mellitus, imunossupressão, hipertensão arterial; tabagistas, etilista ou que façam uso de drogas ilícitas; estiverem em tratamento com medicação de uso contínuo, antibiótico e/ou antiinflamatórios nos últimos 3 meses; terem recebido limpeza profissional ou tratamento periodontal nos últimos 6 meses; e gestantes com gestação múltipla, com diagnóstico de malformações fetais e história de abortamento.
- O embasamento teórico apresentado sustenta o objetivo do estudo.
- Há uma descrição de orçamento financeiro e a indicação de que o projeto será de responsabilidade do pesquisador responsável
- O cronograma está em de acordo com as fases propostas pelo estudo.
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, está em linguagem adequada, clara para compreensão do sujeito, descrição suficiente dos procedimentos, explicitação de riscos e desconfortos esperados, ressarcimento de despesas, indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, informa o sujeito da pesquisa sobre reações adversas, forma do sujeito fazer contatos com o pesquisador responsável informando que está de acordo com a Res. 196/96 CNS.
- A qualificação dos pesquisadores é pertinente para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.
- O pesquisador responsável deve encaminhar a este comitê um 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

Profa. Ms. Cynthia Páez Schmitz Correa  
Coordenadora – CEP/UFJF

RECEBI

DATA: \_\_\_/\_\_\_/2008

ASS: \_\_\_\_\_

**ANEXO B – Autorização do Laboratório de Genética Molecular Dr. Mário Luiz Martinez da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora.**


**Embrapa**

**Gado de Leite**

**DECLARAÇÃO**

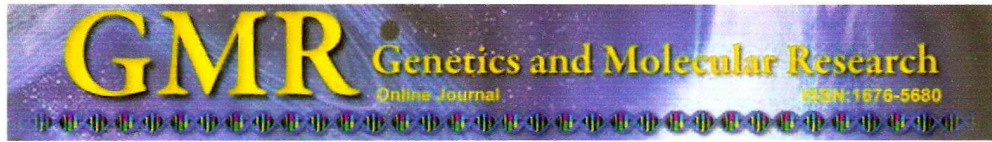
Declaro que concordo em exercer a atividade de co-orientação no Projeto de Pesquisa “Doença periodontal em gestantes – expressão gênica de citocinas inflamatórias e óxido nítrico” a ser executado pela cirurgiã-dentista Cristiane Corsini Medeiros Otênio, sob orientação da Profa. Dra. Rosangela Almeida Ribeiro, no Programa de Pós-Graduação em Saúde – Área de Concentração em Saúde Brasileira. As atividades referentes a análises genéticas prevista no projeto serão desenvolvidas no Laboratório de Genética Molecular sob minha supervisão.

Juiz de Fora, 07 de julho de 2008

  
Dra. Marta Fonseca Martins Guimarães  
Pesquisadora A - CRBio 13681/4-D  
Embrapa Gado de Leite



**ANEXO C** – Aceite de publicação do artigo científico intitulado “*Expression of IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , and iNOS in pregnant women with periodontal disease*”, na revista GMR – *Genetics and Molecular Research*.



Ribeirão Preto, 12 de Junho de 2012.

Prezados Autores,

Informamos que o artigo “**Expression of IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , and iNOS in pregnant women with periodontal disease**”, **GMR 2082**, de autoria de C.C.M. Otenio, I. Fonseca, M.F. Martins, L.C. Ribeiro, N.M.S.P Assis, A.P. Ferreira and R.A. Ribeiro, foi aceito para publicação na *Genetics and Molecular Research (GMR)*.

Aproveitamos a oportunidade para informar que a GMR está indexada em 74 bases de dados, entre elas: Index Medicus, PubMed, Medline e ISI. E tem fator de impacto 1,083, segundo JCR - junho 2011.

Atenciosamente,

Francine Muniz  
Coordenadora editorial (Mtb 44.300)  
Genetics and Molecular Research  
[www.funpecrp.com.br/gmr](http://www.funpecrp.com.br/gmr)  
Tel. (16) 3620-1251 - Fax. (16) 3621-1991

**ANEXO D** – Normas de publicação do periódico GMR – *Genetics and Molecular Research*.



**Preparation of the manuscript – GMR**

Order the sections comprising the manuscript as follows: title, running title, author, address, abstract, key words, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgments, and references.

**Title Page:** The title page should include the title of the article, authors' names, and authors' affiliation. The affiliation should comprise the department, institution (usually university or company), city, and state (or nation). The title page should include the name and complete mailing address, telephone number, fax number, and e-mail address of the author designated to review proofs. The title page should start below the top margin, be single-spaced, and have no space left before the Summary/Abstract. A running title of no more than 60 characters (including spaces) should be provided.

**Abstract:** An abstract of up to 250 words, single-spaced, is required of research articles and reports and should be arranged in one paragraph. The following information (without headings) should be included: purpose, methods, results, and conclusions. Review articles also require an abstract, which need not include all of these items.

**Key words:** A list of key words or indexing terms (up to six) should be included.

**Text**

**Format:** Headings should be bold, and first letters capitalized and left-aligned. All text should be set in Times New Roman font, 12 point, left-aligned, single-spaced. Do not justify the right margin. Leave only one (1) space after periods. Paragraphs should not be indented; there should not be any blank lines between them. Use line returns only at the end of paragraphs. Do not use tabs or spaces to create indents. Use the Symbol font for symbols and special characters. Do not use equation editors or footnoting utilities. Save equations as images. Equations should be numbered consecutively with Arabic numerals in parentheses on the right hand side of the page.

**Footnotes:** Footnotes should be avoided. When their use is absolutely necessary, footnotes should be numbered consecutively using Arabic numerals and should be placed at the bottom of the page to which they refer. Place a line above the footnote, so that it is set off from the text.

**Tables/Charts:** Special care should be taken to ensure that all tables are properly formatted. Scientific symbols used should be in Symbol or Times New Roman. Tables should be on a separate page, numbered consecutively (with Arabic numerals) referred to by number in the text and designed to fit the column or page size of the journal. Use tables with cells to separate columns. Do not use spaces, tabs or vertical lines. Left justify the title above the table. Indicate each table's location within the manuscript.

**Illustrations:** Illustrations/figures (photographs, drawings, diagrams, and charts) should each be in a single file, numbered in a consecutive series of Arabic numerals in the order in which they are cited in the text. Illustrations must be submitted as separate files. All illustrations are to be supplied in JPEG (jpg) format in either color or black and white. Images must be saved as separate, stand-alone files. The image resolution should be 300 dpi. Do not embed images within the text file. The placing of graphics in the paper should be indicated in the text and should include the captions for the figures. The authors should also send, by mail, a printed version of the figures. These should be at least 10 x 15 cm, up to US letter size, so that figures can be scanned (in case the figure files are not adequate) to guarantee good quality for publishing online.

**Abbreviations:** Try to use abbreviations in the text sparingly. Write out abbreviations in full before the first time they are used in the text. Use the metric system for all measurements without periods (cm, mL, s). Define all symbols used in equations and formulas. Do not abbreviate the word "Figure" or "Table" in titles or text.

**Acknowledgments:** All acknowledgments (including those for grant and financial support) should be typed in one paragraph directly preceding the reference section. Authors of manuscripts submitted to GMR are requested to state the source of all funding that enabled the described research to be undertaken.

**References:** References in the text should include the name of the author and the year in parentheses, e.g. (Searle, 1961) or (King and Wilson, 1975). When a reference with more than two authors is cited, only the first author is named, e.g. (Comstock et al., 1958). The references must be cited in the text in chronological order, e.g. (Ideber, 2001; Uetz, 2002; Ottavai, 2004). References to "unpublished results" and "submitted

papers” should appear in the text in parentheses following the name(s) of the individual(s). Example: (Pereira KS, Martins PK and Silva TM, unpublished results). No more than 40 references should be cited in a Full-length paper, 20 references in a Short Communication and 60 references in a Review article.

References, under the heading “References”, should include only works referred to in the text. This section should be arranged in alphabetical order under the first author’s last name. References should be cited as follows: journal papers – names and initials of the first four authors (after that using et al.), year, journal abbreviated according to PubMed or Web of Science, volume number, first and last page numbers; books - names of authors, year, full title, edition, publishers, address (city); articles published in symposia – names of authors, year, full title of book, name(s) of editor(s) in parentheses, publisher, address (city), first and last page numbers.

The references should consist mainly of articles from indexed journals. References for techniques that are essential for understanding or repeating the methods should always be in easily accessible (indexed) journals.

Reference style: The list of references at the end of the paper should follow the format requested by GMR.

### **Examples of bibliographic style**

#### **JOURNAL (Standard article). Ex.:**

Chao EC and Lipkin SM (2006). Molecular models for the tissue specificity of DNA mismatch repair-deficient carcinogenesis. *Nucleic Acids Res.* 34: 840-852.

Ranke MB, Lindberg A, Ferrandez Longas A, Darendeliler F, et al. (2007). Major determinants of height development in Turner syndrome (TS) patients treated with GH: analysis of 987 patients from KIGS. *Pediatr. Res.* 61: 105-110.

**BOOK, WHOLE:** authors, year, book title, edition or volume number, publisher, city. **Ex.:**

Bartholomei-Santos ML and Sokal RR (1973). Numerical taxonomy. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

Cicotti and Tildesley DJ (1987). Computer simulation of liquids. 1st edn. Oxford University Press, New York.

**BOOK CHAPTER:** authors, year, book title, chapter title, editors, edition, publisher, city, pages of citation. **Ex.:**

Drosopoulou E (1981). The Drosophilidae: A Taxonomic Overview. In: The Genetics and Biology of *Drosophila* (Ashburner M, Carson HL and Thompson JN Jr, eds.). Academic Press, New York, 1-97.

**REPORT. Ex.:**

CIAT (International Center for Tropical Agriculture) (1980). Annual Report. CIAT, Cali.

FAO (Food and Agricultural Organization) (2004). Production Yearbook. FAO, Rome.

**THESIS. Ex.:**

Hellmann K and Gömori G (1997). Estudo citoquímico em glândulas salivares de triatomíneos do gênero *Rhodnius*. Master's thesis, UNESP, São José do Rio Preto.

Pepin L (2003). Aplicação de marcadores microssatélites de *Sus scrofa* doméstica na caracterização genética de populações de *Sus scrofa* sp (porco-monteiro) e *Tayassu pecari* (queixada). Doctoral thesis, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto.

**CONFERENCE, SYMPOSIUM PROCEEDINGS:** cite papers only from published proceedings. **Ex.:**

Lehninger AL, Silva MB, Lombardi F, Zamaro PJA, et al. (2002). Análise do comportamento eletroforético das frações de hemoglobinas de *Rhinoclemys punctularia* (Chelonia) em diferentes pH. In: Anais do 48º Congresso Nacional de Genética, Ribeirão Preto.

Olsen GJ, Ludwig T, Meier H and Wolf MJ (2002). AxML: a fast program for sequential and parallel phylogenetic tree calculations based on the maximum likelihood method. Proceedings of 1st IEEE Computer Society Bioinformatics Conference (CSB2002), Palo Alto, 21-28.

Pacheco EB and Miyazawa CS (2002). Estudos citogenéticos em Cheirodontinae (Characiformes, Characidae) do pantanal do Mato Grosso. In: IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Maringá, 38.

Schaeffer LR, Swalve HH and Dekkers JCM (1994). Random regressions in animal models for test-day production in dairy cattle. Proceedings of the 5th World Congress of Genetic and Applied Livestock Production, Guelph, 433-446.

**ELECTRONIC CITATIONS (Online Journals):** ensure that URLs are active and available. **Ex.:**

Rozen S and Skaletsky HJ (2000). Primer3: Bioinformatics Methods and Protocols. In: Methods in Molecular Biology (Krawetz S and Misener S, eds.). Humana Press, New Jersey, 365-386. Available at [[http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)].

**INTERNET COMMUNICATION:** Ensure that URLs are active and available.

**Ex.:**

HTML. HyperText Markup Language. Available at [<http://www.w3.org/TR/html401/>]. Accessed August 23, 2007.

NCICB. National Cancer Institute Web Services. Available at [[http://ncicb.nci.nih.gov/inrastructure/cacore\\_overview](http://ncicb.nci.nih.gov/inrastructure/cacore_overview)]. Accessed August 23, 2007.

Wolf MJ (2005). Global review of commercialized transgenic crops: 2005. The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). Available at [<http://www.isaaa.org/kc/bin/briefs34/pk/index.htm>]. Accessed August 21, 2006.

**ANEXO E – Trabalho apresentado sob a forma de pôster no 7º Congresso Odontologia 2010 – Juiz de Fora/MG. Este trabalho refere-se a resultados parciais do estudo piloto.**



Radiograficamente se apresenta inicialmente como uma lesão radiolúcida unilocular ou multilocular, dando o aspecto de um ameloblastoma, mas pode aparecer como uma imagem mista quando existe a formação de material calcificado como osso, cimento ou dentina. Levando em consideração que esta é uma condição de escassa casuística e o fato da existência de diferentes critérios quanto à terapêutica, foi considerada de interesse a apresentação de um caso clínico atípico de fibroma odontogênico central e a discussão de seus aspectos clínicos, radiográficos e histopatológicos.

**08. EXPRESSÃO GÊNICA DE IL-6 EM GESTANTES COM E SEM DOENÇA PERIODONTAL**

Cristiane Corsini Medeiros Otenio, Isabella Silvestre Barreto Pinto, Isabela Fonseca, Marta Fonseca Martins Guimarães, Rosângela Almeida Ribeiro

Na doença periodontal, os componentes e produtos bacterianos agredem o tecido adjacente, induzindo a formação de um infiltrado inflamatório intenso. Ocorrem, concomitantemente, a síntese, a secreção e a ativação de uma série de mediadores químicos pró-inflamatórios como a interleucina 6 (IL-6). Considerando que o indivíduo desempenha um papel essencial na progressão da doença periodontal, o presente estudo se propõe a avaliar o padrão de expressão gênica da citocina inflamatória IL-6 no tecido periodontal de gestantes com e sem doença periodontal, pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real. Os dados obtidos foram expressos na forma de valores de Ct e a quantificação relativa realizada. A comparação entre os dois grupos foi realizada por meio do programa Rest© 2008. Para a padronização das condições experimentais um estudo piloto foi realizado. Esse estudo consiste na análise da expressão do gene *IL-6* em dois *pools* constituídos de amostras de tecido gengival de gestantes com e sem a doença. As melhores concentrações de *primer* e cDNA para o gene alvo *IL-6* e o controle endógeno  $\beta$ -*actina* foram 100 e 50 nM, respectivamente. A eficiência de amplificação do gene alvo e do controle endógeno foi 0,9 para os dois alvos, Não foram observados picos de amplificação referentes a dímero de *primers* ou produtos inespecíficos para nenhum gene analisado, quando analisado a curva de dissociação. Conclui-se deste modo que as condições pré-estabelecidas para a análise poderão ser utilizadas para traçar um perfil de expressão diferencial para os grupos do estudo.

**09. USO DE TOMOGRAFIA CONE BEAM EM ENDODONTIA: RELATO DE CASO CLÍNICO**

**ANEXO F - Trabalho apresentado sob a forma de pôster na IADR (*International Association for Dental Research*) 2011 – San Diego/California. Este trabalho refere-se a resultados parciais do estudo piloto.**

Paper: Periodontal disease in pregnancy – gene expression of nitric oxide (IADR/... Página 1 de 1

[Abstracts](#) [Author Index](#) [Keyword Index](#) [Search](#) [Help](#) [Main Menu](#)



2804 PERIODONTAL DISEASE IN PREGNANCY – GENE EXPRESSION OF NITRIC OXIDE

Friday, March 18, 2011: 4:30 p.m. – 4:45 p.m.  
Location: Hall C (San Diego Convention Center)  
Presentation Type: Poster Session

C.C.M. OTENIO, Odontopediatria, Universidade Federal De Juiz De Fora, Juiz de Fora, Brazil, M.F.M. GUIMARÃES, Molecular Biology Laboratory, Embrapa Dairy Cattle, Juiz de Fora, Brazil, N.M.S.P. ASSIS, Universidade Federal De Juiz De Fora, Juiz de Fora, Brazil, and R.A. RIBEIRO, Universidade Federal De Juiz De Fora, Juiz de Fora, Brazil

**Objective:** This study aimed to determine the standard of gene expression of iNOS in gingival tissue from pregnancy women with and without periodontal disease. **Method:** Data were expressed as Cycle threshold ( $C_t$ ) values and relative quantification performed. The comparison between the two groups was performed using the program Rest<sup>®</sup> 2008. Gingival tissue was collected from an area with presence of periodontal pockets deeper than 4 mm in women with periodontal disease. In women without periodontal disease gingival tissue was collected from adjacent tissue to teeth with indication for extraction. All samples were collected during dental care in a School of Dentistry in Juiz de Fora, in the state of Minas Gerais, Southeast region of Brazil. Samples of gingival tissue (about 54 mg) were immediately immersed in 1.5 mL RNeasy Lysis Buffer and stored at -20 °C. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), following the manufacturer's recommendations. The first strand was synthesized and cDNA analysis of iNOS was performed by means of Real Time PCR. **Results:** This study analyzed the expression of iNOS gene and the endogenous controls  $\beta$ -actin and GAPDH were 100 nM–400 ng, 50 nM–100 ng and 200 nM–100 ng, respectively. The amplification efficiency of target gene and endogenous controls was 0.9 and the temperatures of dissociation were 79°C, 86.2°C and 86.5°C, respectively. There were no peaks related to the amplification primer dimer or nonspecific products to any genes when analyzing the dissociation curve. **Conclusion:** The pre-established conditions for the analysis will be able to draw a profile of differential expression for each group.

**Keywords:** Enzymes, Gene expression, Inflammation and Periodontal disease

See more of: [Periodontal Infections: Diagnostic/Prognostic Markers](#)  
See more of: [Periodontal Research - Diagnosis / Epidemiology](#)

<< Previous Abstract | Next Abstract >>

© Copyright 2011 International Association for Dental Research. All Rights Reserved.