

Doença Periodontal: Patógenos e Prematuridade

Periodontal Disease: Pathogens and Prematurity

Elizete da Rocha Vieira de Barros¹

Durval Batista Palhares¹

Pedro Alves Campos²

Anna Maria Miglioli¹

Francisco de Oliveira Vieira¹

Marilene Garcia Palhares¹

Almir de Sousa Martins^{7 1}

1- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

2- Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais – PUCMG

alisbetermster@gmail.com

RESUMO

A doença periodontal engloba uma série de alterações que ocorrem no periodonto a partir da formação do biofilme dental, caracterizado pela presença de uma gama de micro-organismos. Alguns destes, pelas suas características singulares, são fortemente associados à patologia, tais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. O objetivo deste trabalho é selecionar e avaliar artigos que abordem as características destes micro-organismos, com ênfase nos mecanismos de ação, fatores de virulência, e doenças relacionadas, bem como arrolá-los aos ensaios envolvendo a prematuridade.

Descritores: doença periodontal, gravidez, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*.

INTRODUÇÃO

A doença periodontal configura-se como uma das afecções bucais de maior expressão devido à sua alta prevalência, principalmente na população adulta. Resulta numa grave consequência para o paciente, incluindo perda dentária por falta de adesão do dente aos tecidos que o circundam. Fatores genéticos e ambientais estão associados à doença, mas os micro-organismos do biofilme dental são vitais neste processo^{1,2}. Para manter a homeostase do tecido periodontal, o indivíduo necessita produzir uma resposta imune capaz de controlar esta colonização bacteriana, fato este, observado pela presença dos mesmos em situações de saúde periodontal³. O desenvolvimento da doença depende da virulência do micro-organismo, do nível de resposta imune do hospedeiro e das condições bucais, que permitem a formação do biofilme dental e

sua evolução. Deste contexto, participam espécies que apresentam mecanismos próprios e possuem diversos fatores de virulência. Estas são denominadas patógenos periodontais, e dentre estas estão: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e a *Porphyromonas gingivalis*, de interesse deste estudo. Tais micro-organismos induzem a formação de substâncias que exigirão uma resposta imune e inflamatória do hospedeiro, produção de citocinas e outros mediadores químicos. A disseminação sanguínea destas citocinas ou dos próprios agentes microbianos levam a uma proposição de relações da doença periodontal às doenças sistêmicas e condições particulares como a ocorrência de partos prematuros.

A prematuridade do parto é caracterizada no Brasil como de alta prevalência. Está associada a cerca de 75%

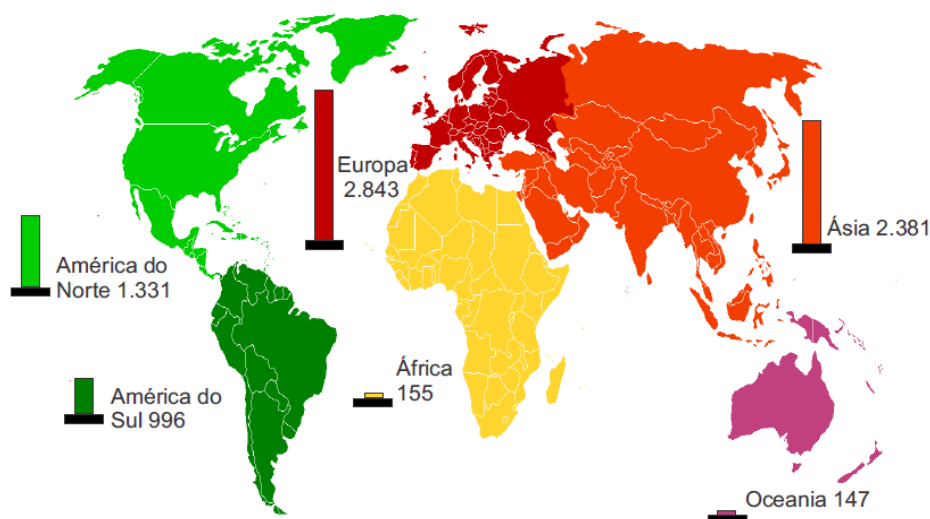
da mortalidade neonatal. Sua incidência aumentou nas duas últimas décadas, tornando-se um problema de saúde pública com consequências econômicas de impacto social e repercussões importantes, levando a complicações no parto e riscos para o recém-nascido. As principais causas associadas e consideradas clássicas, ainda não elucidam todos os casos, o que justifica a necessidade de mais estudos. Neste sentido o presente trabalho busca discorrer sobre as características destes dois patógenos, amplamente associados a doença periodontal. O biofilme é uma comunidade microbiana indefinida, associada à superfície dentária e à doença

periodontal, com influência na gravidez e na ocorrência de partos prematuros.

Estruturação do estudo: Este trabalho foi previamente estruturado em quatro fases:

* 1] Investigação na base Pub Med de artigos na língua inglesa relacionados ao termo “doença periodontal”, sendo encontradas 8.258 publicações sobre o tema entre os anos de 2010 a 2012 mapa I. Procurou-se apurar aqui a origem destas publicações, buscando agrupá-las mundialmente, em sete continentes Figura I. Foi detectado um grande interesse por este estudo, demonstrado no quadro I

Distribuição de artigos relacionados a "Doença Periodontal" nos anos 2010-2012



AMÉRICA DO NORTE, CENTRAL E CARIBE	1331
AMÉRICA DO SUL	996
AFRICA	155
EUROPA	2843
OCEANIA	147
ÁSIA	2381
NÃO IDENTIFICADO	405
TOTAL	8258

Quadro I – Número de artigos da base PUB MED relacionados a doença periodontal, publicados entre 2010-2013, por continente.(valores extraídos do banco de dados PUB MED atualizados até a data de 16/01/2013).

Na América do Sul, onde estão inclusos os artigos brasileiros, neste período, 996 artigos foram verificados, o que denota que a produção científica nesta área, tem sido realizada, porém em análise

quantitativa mostra ainda grande possibilidade de busca, o que justifica a intenção deste estudo. Ressalta-se que estes dados referem-se às publicações que envolvem a doença periodontal de forma genérica;

* 2] Aprofundamento da investigação, visando artigos que abordam os micro-organismos alvos, cujos resultados produziram um escore de classificação, proposto pelos autores (amplamente associados, moderadamente associados e fracamente associados). Baseados no número de publicações, foram apontados os micro-organismos: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga sp.*, como amplamente associados à doença periodontal e com interesse positivo de publicações.

* 3] Em uma terceira fase, foram selecionados, dentre os micro-organismos amplamente associados, os relacionados com artigos em ascendência e de grande interesse da comunidade científica. Estes envolviam o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*;

* 4] A última fase consistiu na classificação dos artigos selecionados com a temática gravidez e pré-termo, invocando o envolvimento destes à doença periodontal. Nova organização foi debatida, originando uma busca guiada, em uma disposição de síntese.

Na América do Sul, onde estão inclusos os artigos brasileiros (Quadro I, Figura 1), neste período 996 artigos foram detectados, o que denota que a produção científica sobre a temática doença periodontal tem sido realizada, porém quando se refina a busca e mundialmente comparamos a associação doença periodontal - gravidez (periodontal disease and pregnancy) e doença periodontal e parto pré-termo (periodontal disease and preterm), o número de artigos, diminui consideravelmente, 240 e 117, respectivamente. Desta forma, em análise quantitativa, o tema encontra questionamentos que suscitam grande interesse, principalmente devido às associações propostas, evidenciando que a prevalência de partos prematuros, apesar dos avanços da medicina e das conquistas tecnológicas aplicadas à assistência ao pré-

natal, ainda se configura como um grande problema de saúde pública.

REVISÃO DA LITERATURA

AGGREGATIBACTER

ACTINOMYCETEMCOMITANS

É gram negativo, capnófilo, fermentador de carboidratos. Estudos o relacionam com casos de periodontite agressiva e de periodontite crônica^{4,5,6}. Coloniza a cavidade oral como agente localizador e causador da periodontite agressiva de rápida progressão que afeta indivíduos jovens, com aumento da profundidade da bolsa periodontal, e perda óssea^{7,8}. Pode estar presente em indivíduos clinicamente saudáveis no aspecto periodontal.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans expressa fatores de virulência, ligados à aderência e invasão tecidual, produção de fatores de resistência antimicrobiana, fatores citotóxicos e imunossupressores. Produzem ainda duas toxinas, a leucotoxina e a toxina distensora citoletal (CDT - Cytolethal distending toxin)^{9,10}. Ambas, tem a capacidade de causar morte das células do hospedeiro e podem ativar a expressão de moléculas do hospedeiro com capacidade de induzir a reabsorção óssea. A leucotoxina age de duas formas, a primeira, por meio da ativação de uma nuclease com poder de clivar o DNA das células alvo e a segunda, produzindo poros na membrana plasmática, proporcionando a formação de canais iônicos, o que pode despolarizar a membrana, levando à perda de potássio intracelular, e à morte da célula⁹. Por outro lado, a leucotoxina que ocorre em adolescentes, com doença periodontal agressiva, potencializa a bactéria a evadir a resposta imune do hospedeiro durante a infecção, e esta tem uma forma ímpar, a de visar especificamente os leucócitos⁸. Roman-Torres et al.,⁵ observaram que há uma significativa perda de inserção periodontal em pacientes com alta produção de leucotoxina, quando comparados a pacientes com uma pequena variedade leucotóxica ou pacientes que não foram infectados, levando ao entendimento de que a produção da

leucotoxina pelo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* seja um mecanismo usado pela bactéria para desviar uma resposta imune do hospedeiro. A leucotoxina procede das toxinas RTX (repeats in toxin; referindo-se às regiões C terminais das toxinas que são ricas em repetições de glicina e aspartato) que produzem a hemolisina. Apenas alguns micro-organismos a possuem, dentre estes o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. As RTX possuem 116 KDa, codificadas em uma estrutura única, o operon rtx cromossômico, formado por quatro genes (Ltxc, Ltxa, Ltxb e Ltxd), e tem a propriedade de causar citotoxicidade em neutrófilos e macrófagos. Existe um comportamento diferenciado dos genes. O LtxA tem influência capital na atividade citolítica da leucotoxina, observando que existem cepas que produzem quantidade superior de toxina do que aquelas cepas consideradas menos leucotóxicas⁸. Os outros genes também assumem papéis que operacionalizam a ação do micro-organismo, enquanto o gene Ltxc é responsável por codificar uma proteína capaz de ativar a leucotoxina produzida pelo gene Ltxa. Os genes Ltxb e Ltxd codificam peptídeos que participam do transporte do produto para a superfície celular bacteriana. A sua secreção ocorre após o reconhecimento de uma sequência sinal localizada no C-terminal da proteína¹¹.

A toxina distensora citoletal – CDT (Cytolethal distending toxin) foi descoberta afeta vários tipos de células, inibindo a proliferação e induzindo a morte celular. Age por meio da modificação morfológica nas células alvo, podendo inibir o crescimento das células epiteliais, endoteliais e fibroblásticas, bem como linfócitos T e B, prejudicando irremediavelmente a resposta do hospedeiro. Tanto a RTX como a CDT não são produzidas por outras espécies de bactérias conhecidas, que colonizam a cavidade oral. A CDT codificada pelo operon cdt em *A. actinomycetemcomitans* constitui-se na única toxina bacteriana conhecida capaz de levar o DNA das células alvo a um dano imediato¹².

O *A. actinomycetemcomitans* apresenta antígenos de superfície determinantes dos diversos sorotipos que caracterizarão cada espécie, variando de A a F, estando relacionados com a patogenicidade. Consta-se assim uma heterogeneidade clonal na virulência entre as diversas cepas, levando à observação de que um indivíduo com um sorotipo de *A. actinomycetemcomitans*, venha ser colonizado por diferentes genótipos bacterianos, o que pode ocasionar modificações decorrentes da desagregação colonial. Podendo ocorrer no processo de captação e incorporação genômica de fragmentos de DNA extracelular, por transformação bacteriana, o aparecimento de linhagens clonais genotipicamente diferentes, influenciando sobremaneira o status da virulência. Consequentemente, o aparecimento dos clones estrutura a população de *A. actinomycetemcomitans* com sorotipos diferentes A, B e C⁵. Dentre os sorotipos mais expressivos está o sorotipo B, denominado JP2, altamente leucotóxico, caracterizado por uma deleção no par de bases de posição 530, que é responsável pelo gene da regulação da produção e expressão da leucotoxina. Pacientes portadores do clone desta tipagem apresentam estágios mais avançados da doença. Este é particularmente isolado em populações africanas. Porém, estudos com caucasianos, constataram que o JP2 pode estar presente nesta população¹³. Sua presença foi detectada em indivíduos mais velhos. Por outro lado, Sakellari et al.¹⁴ investigaram a distribuição destes sorotipos do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e prevalências em amostras subgengivais de indivíduos gregos, mas não foi detectado o JP2 nesta população. Estudos avaliando a presença e função dos anticorpos sistêmicos, para a leucotoxina, produzida pelo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foram realizados na Suécia, em indivíduos de meia idade, com fatores médicos relacionados a doenças cardiovasculares. Amostras de soro foram examinadas contra anticorpos para leucotoxina, através de

western blot. Investigou-se também a capacidade de neutralização da leucotoxina em ensaio de atividade leucotoxina e cultura de células leucêmicas. Os resultados mostraram uma alta prevalência de anticorpos contra a leucotoxina produzida pelo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na população analisada. Estes anticorpos foram correlacionados com a capacidade de neutralização da leucotoxina, bem como com os títulos de ELISA de *A. Actinobacillus* específico, IgA e IgG. Além disso, níveis elevados de anticorpos para leucotoxina foram correlacionados com o aumento da idade, mas não com parâmetros de doença periodontal ou fatores de risco cardiovasculares. Concluiu-se que os anticorpos sistêmicos anti-leucotoxina do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, eram comuns nesta população adulta sueca. Estes anticorpos podem contribuir para limitar os efeitos sistêmicos da infecção⁹.

As bacteremias ocorrem geralmente em condições onde a doença periodontal está presente e podem estar associadas a doenças sistêmicas³. Entre estas, temos as endocardites infecciosas. Yang et al.,¹⁵, descreveram o curso clínico e a evolução de pacientes com infecção invasiva pelo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em um período de 19 anos (1985-2004) e onze pacientes apresentaram complicações significativas. Eles observaram que as lesões da cavidade oral foram os prováveis portais de entrada, e nestes incluem-se dentes com cárie, periodontite ou radioterapia de campo orelha-nariz e garganta.

PORPHYROMONAS GINGIVALIS

Trata-se de bactéria anaeróbia estrita, gram-negativa de primordial importância como patógeno periodontal, que se desenvolve quando há decréscimo da pressão de oxigênio, precedida pela ação de colonizadores primários^{17,19}. Caracteriza-se por possuir mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo, o que faz com que este micro-organismo sobreviva dentro das bolsas periodontais,

mesmo quando exposto a condições aeróbicas. Pode ser encontrada em proporções reduzidas em indivíduos sem perda de inserção clínica, podendo ser reconhecida como parte da microbiota normal.

A *Porphyromonas gingivalis* é um cocobacilo, reconhecido como um agente etiológico principal da doença periodontal, relacionado à periodontite crônica, exibindo uma variedade de fatores de virulência, intimamente associados com formas generalizadas desta doença^{18,19}. Está envolvida também nas infecções do canal radicular. A invasão de células não fagocíticas pela *P.gingivalis* é um evento que pode ocorrer, sinalizando o caráter oportunista do micro-organismo, que pode multiplicar-se no citoplasma e permanecer dentro da célula, fato este que pode estar ligado à sustentação da cronicidade da lesão do periodonto e pode tornar mais difícil o seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro, o que pode levar à multiplicação e disseminação nos tecidos adjacentes²⁰. Apresenta fatores de virulência diversos, assim como outros micro-organismos, relacionados à sua aderência aos tecidos hospedeiros, sua proteção à resposta imune, bem como a mecanismos de destruição tecidual. Tais determinantes da virulência acontecem também devido a uma variedade de enzimas produzidas em seu metabolismo²¹. Tais enzimas são liberadas no meio onde o micro-organismo se instala, manejam as vias de sinalização celular, garantindo que o mesmo permaneça no meio intracelular. Produz vários tipos de enzimas proteolíticas, incluindo Arg-gingipain (Rgp) e lys-gingipain (Kgp), collagenases, e uma Dipeptidyl aminopeptidase IV. Embora estas enzimas tenham funções fisiológicas para *P.gingivalis*, elas têm sido sugeridas por desempenhar funções múltiplas no processo patogênico da periodontite. Com efeito, proteases da *P.gingivalis* hidrolisam uma variedade de proteínas sorológicas e teciduais, contribuindo assim para neutralizar o sistema de defesa imune e podem causar a destruição dos tecidos²². O processo de internalização da *P.gingivalis*

em células epiteliais gengivais é mediado pelas fimbrias, na adesão e invasão, envolve a produção de gingipaínas e uma gama de proteínas^{23,24}. Estas fimbrias são componentes filamentosos inseridos e distribuídos sobre a superfície celular da bactéria, que atuam na fixação do micro-organismo às células do hospedeiro. O gene FimA, responsável pela codificação da fimbriolina (subunidade proteica da fimbria), apresenta seis genótipos (tipo I, tipo I b, tipo II, tipo III, tipo IV, tipo V), com base na sequência de nucleótidos²⁰. Incluem nos fatores de virulência, a presença das lipoproteínas, e hemaglutinina, e alguns destes fatores estão associados com a formação de biofilme. No entanto, o mecanismo exato de formação deste é ainda desconhecido. A pigmentação das colônias de bactéria em placas de ágar - sangue está relacionada com a sua virulência²⁵. Wang et al.,²⁰ contextualizou que a *Porphyromonas gingivalis* produz esfingolipídios, promotores de reações inflamatórias em fibroblastos gengivais e um grupo de receptores celulares - Toll-like receptor 2 (TLR2) - dependente de secreção de interleucina-6 a partir de células dendríticas. A nutrição do patógeno é feita por canais especiais ou poros formados por proteínas porinas. Apresenta ainda um lipopolissacarídeo na membrana, denominado LPS, que confere propriedades antigênicas²⁶. A resistência desta bactéria se deve à cápsula polissacarídica, que atua como um depósito de água e nutrientes. Esta funciona também como uma barreira para o seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. A capsula diminui os níveis de transcrição dos genes que codificam a interleucina - 1 β , interleucina-6 e interleucina -8 em fibroblastos, contribuindo significativamente para enfraquecer a resposta do hospedeiro, e permitindo a permanência do patógeno²⁷. A opsonização é afetada pela sua redução e ocorre a potencialização da resistência à fagocitose pelos leucócitos, permitindo a sobrevivência do micro-organismo.

A apoptose é uma importante via pela qual os organismos multicelulares podem extinguir células infectadas,

mantendo sua homeostase. Foi demonstrado em estudos in vitro que a *P.gingivalis* tem potencial para induzir a apoptose de fibroblastos, linfócitos, células endoteliais e epiteliais da gengiva. Para que tal aconteça há necessidade da presença de muitas bactérias por um tempo longo²⁸. Nesta linha, alguns estudos procuraram identificar possível relação com a patogênese de doenças sistêmicas. Recentes ensaios conduzidos por Rohner et al.,²⁹ envolveram a artrite reumatoide (AR) e relação do envolvimento da *P.gingivalis* com a apoptose. Sinalizaram que os pacientes com AR exibem frequentemente doença periodontal, que está associada com patógenos como a *Porphyromonas gingivalis*. Propuseram assim analisar os efeitos diretos de *P.gingivalis* em apoptose de condrócitos humanos (uma característica de doenças inflamatórias articulares) para propor uma inter-relação da patogênese da AR com a infecção. Condrócitos primários foram infectados com *P.gingivalis* e analisados utilizando anexina-V, 7AAD, e iodeto de propídio e examinados por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. A ativação de caspases e fragmentação de DNA foram determinadas por análise de Western blot e reação de TUNEL. Os dados apontaram que *P.gingivalis* promove os estágios iniciais e posteriores, da apoptose nos condrócitos humanos primários, o que pode contribuir para a lesão articular que ocorre na patogênese da artrite reumatóide. Dentro do hospedeiro humano, a maioria do ferro é encontrada no interior das hemácias na forma de hemoglobina, proteínas. Quantidades pequenas de ferro extracelular também são complexadas a proteínas ferro-ligantes, principalmente ferritina, que é encontrada no soro, e lactoferrina presente na superfície das mucosas. O nicho da *Porphyromonas gingivalis* está compreendido juntamente com outras espécies no sulco gengival, uma área que experimenta flutuações na temperatura, no pH, na osmolaridade e na disponibilidade de nutrientes. Elas podem invadir, se reproduzirem e persistirem a altas

densidades nas células epiteliais da gengiva. Há evidências de que o componente da saliva denominado LF – T Lactoferrina pode exibir atividade antimicrobiana contra formas planctônicas da *P.gingivalis* em concentrações mais elevadas, inibindo também a formação do biofilme e reduzindo-o em condições fisiológicas *in vitro* e *in vivo* ³⁰. Estudos conduzidos por Okada et al. ³¹, utilizaram o beta-bloqueador propranolol no tratamento de perda óssea alveolar induzida pela infecção da *P.gingivalis*, com o objetivo de examinar o envolvimento dos nervos simpáticos na destruição periodontal, pelo entendimento de que a noradrenalina liberada a partir de terminais nervosos simpáticos se liga a receptores específicos adrenérgicos em células imunes. O bloqueio dos beta-receptores no tecido periodontal, pelo uso do propranolol, inibiu a diferenciação dos osteoclastos e impediu a perda óssea alveolar induzida pela infecção por *P.gingivalis*. Segundo os autores, estes resultados indicam que o sistema nervoso simpático está envolvido no desenvolvimento da periodontite e sugerem que a modulação do sinal simpático por beta-bloqueadores permite o controle do metabolismo do osso alveolar.

RELAÇÃO DOENÇA PERIODONTAL E PREMATURIDADE

A prematuridade e o baixo peso ao nascer são eventos considerados de extrema importância para a saúde da mãe e da criança. Portanto, a busca de fatores de risco tem sido alvo de investigação ³². Caracteriza-se como parto prematuro o nascimento do bebê antes de 37 semanas e o baixo peso de nascimento, aquele recém-nascido que tem menos de 2.500 g, independente da idade da gestação. Múltiplos fatores de risco são conferidos ao parto prematuro e/ou baixo peso ao nascer. Dentre estes, foram constatadas fortes evidências que ligam a doença periodontal a condições sistêmicas e quando estas ocorrem em mulheres no período gestacional pode ser reconhecida como um fator de risco para a prematuridade e baixo peso ao nascer ^{33,34,35}. Um dos mecanismos

desta plausibilidade consiste no entendimento de que os microrganismos que causam a doença periodontal, principalmente aqueles anaeróbios gram-negativos, constituem fator de risco para partos prematuros e baixo peso ao nascer, e a associação de espécimes bacterianas, potencializam o risco ³⁶. Nestes estudos, a teoria focal tem sido aventada. A doença periodontal está associada a um complexo microbiano, contendo cerca de mais de 500 micro-organismo, muitos dos quais possuem alta virulência. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e outras bactérias do periodonto são únicos para a cavidade oral, tendo em vista que podem disseminar para outros locais do corpo reforçando a tese da infecção focal de origem bucal ³⁷. Estes efeitos estariam ligados aos micro-organismos que teriam como fonte o periodonto e teriam a possibilidade de desencadear uma reação inflamatória via mediadores pró-inflamatórios (prostaglandinas e fator de necrose tumoral) que afetariam a coesão feto-placentária, e poderiam desencadear o parto pré-termo, observando que mulheres com prenúncio de parto pré-termo apresentariam condições periodontais adversas e níveis de interleucina séricos elevados em comparação às mulheres com parto a termo ³⁸.

O Baixo peso ao nascer tem sido considerado um decisivo fator de morbidade e mortalidade neonatal ³⁹. Também tem sido sinalizado como um problema conhecido em todo o mundo e parece ser mais acentuado nos países em desenvolvimento. Na Índia, Chakki et al., ³⁹ correlacionaram o baixo peso do bebê ao nascimento com a idade da mãe (IMC), índice de placa (IP) e índice periodontal comunitário (CPI). Concluíram que a periodontite foi significativamente associada ($p < 0,0005$), com a redução de peso de nascimento. Em relação às características dos micro-organismos envolvidos, Li et al., ⁴⁰ (que investigavam mecanismos de associação destes com o BPN, estudaram especificamente o lipopolissacarídeo (LPS) produzido pelo

Actinobacillus actinomycetemcomitans, e este teve a capacidade de induzir a apoptose em trofoblastos humanos pela via mitocôndria-dependente e concluíram que esta implicação poderia contribuir para a patogênese da periodontite associada ao baixo peso ao nascer. Todavia, estudos envolvendo populações específicas, como os realizados na Malásia por Ali e Abidin⁴¹, não atestaram a periodontite como fator de risco para pré-termo e baixo peso ao nascer, utilizando-se a determinação de índices periodontais. Vogt et al., 2010⁽⁴²⁾, em estudos no Brasil, propuseram a avaliação da doença periodontal e a associação com resultados perinatais adversos, por meio de um estudo de coorte que acompanhou 327 gestantes de baixo risco, divididas em grupos com e sem doença periodontal. Foram utilizados índices de placa e sangramento gengival à sondagem, profundidade clínica de sondagem, nível clínico de inserção e retração gengival (exame periodontal abaixo de 32 semanas de gestação). As taxas de nascimento prematuro (PTB), baixo peso ao nascer (BPN), pequenos para a idade gestacional (PIG) recém-nascidos e ruptura de membranas (RPM) foram avaliados utilizando-se Índices de Risco (IC 95%) e frações de risco atribuível à população. Constatou-se que a doença periodontal foi um fator de risco para a PT, BPN e PROM (ruptura prévia da membrana) entre as brasileiras gestantes de baixo risco. Swati et al.,⁴³ procuraram, também nesta linha de pesquisa, descobrir evidências isolando patógenos periodontais específicos em amostras orais e de tecido placentário utilizando material de mães hipertensas e normotensas em parto via cesariana. Dentre as bactérias estudadas estavam a *P.gingivalis* e a *Agregatibacter actinomycetemcomitans*. Os resultados levaram à observação de que a prevalência de periodontopatógenos foi mais evidenciada no grupo hipertenso que no controle. Este micro-organismo foi detectado em todas as amostras da placa subgengival e placentas estudadas, independentemente do status da doença periodontal. Nesta concepção, considera-

se que a colonização oral de bactérias gram-negativas anaeróbias tem sido apontada como um fator de risco para parto prematuro de bebês de baixo peso³⁶. Hasegawa-Nakamura et al.,⁴⁴, contextualizaram que a *P.gingivalis* pode ser encontrada no líquido amniótico e na placenta de mulheres com doenças obstétricas. Para tanto cultivaram células do córion estimuladas com o lipopolissacarídeo da *P.gingivalis* verificando a expressão do gene que codifica o receptor (TLR-2)- Tool like receptor-2. PCR em tempo real foi utilizado para avaliar a expressão de mRNA dos genes TLR-2 e o Tool like receptor – 4 (TLR-4) nas células, sendo ainda medidos os níveis de interleucina-6 e interleucina-8 nos sobrenadantes de cultura, pelo método de ELISA. Como resultado obtiveram que a *P.gingivalis* foi detectada em tecido coriônico de 06 mulheres (n=23), duas com ameaça de parto prematuro, duas com gravidez múltipla e duas com placenta prévia, constatando que o lipopolissacarídeo da *P.gingivalis* induziu a produção das interleucinas -6 e -8 via TLR-2 em células derivadas do córion. Sert et al.,³⁸ objetiveram a avaliação dos níveis de soro de interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF)- α , fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento placentário (PIGF), e receptor VEGF solúvel (sVEGFR) -1 e -2 na associação entre doença periodontal e resultados adversos da gravidez. Participaram mães que tiveram bebês a termo, pré-termo, baixo peso ao nascer e mulheres não grávidas, relacionando as mães com idade gestacional e peso da criança. Houve coleta de sangue venoso para avaliação do soro (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , VEGF, PIGF, e sVEGFR-1 e -2 níveis). Verificaram que os níveis séricos de IL-1 β , VEGF, e sVEGFR-1 e -2 podem ter um efeito potencial sobre o mecanismo da associação entre doença periodontal e resultados adversos na gravidez. Muitos estudos foram realizados neste sentido. Gonzales Marin et al.,³⁴ determinaram os níveis e a proporção das bactérias periodontais em aspirado gástrico neonatal, provenientes

de gravidez com alguma intercorrência importante. O trabalho também verificou se os micro-organismos poderiam ser encontrados em amostra oral e vaginal de mães, através de PCR e, conseqüentemente, detectaram a presença da *P.gingivalis* em amostras colhidas dos neonatos. Em adição, Haje et al.,⁴⁵, através de ensaio clínico com mulheres coreanas, objetivaram a confirmação das associações entre comportamentos de saúde bucal, periodontite e pré-eclampsia e concluíram que a pré-eclampsia poderia estar associada às condições materno-periodontal e limpeza interdental. Ávila et al.,⁴⁶ determinaram, especificamente, a doença periodontal em mulheres grávidas com doença valvar reumática, relacionando-a a risco de endocardite infecciosa, à maior taxa de nascimento prematuro e a baixo peso ao nascer. Eles avaliaram por meio do exame periodontal (por profundidade de sondagem, margem gengival, nível clínico de inserção, sangramento e índice de placa) e da análise microbiológica realizada em amostras de soro e fluido gengival, considerados controles positivos para *P.gingivalis*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans* e *Tanerella forsythia*. Metade das mulheres pesquisadas apresentavam doença valvar reumática e metade era saudável (n=140). Os resultados entre elas foram compatíveis. Inflamação periodontal apresentava relação com o crescimento fetal (foi realizada avaliação do fêmur) com o peso ao nascer e o tempo de nascimento, após tratamento periodontal da mãe, concluíram que a profundidade de sondagem (PPD) e nível clínico de inserção (CAL) aumenta significativamente o risco de parto prematuro e / ou baixo peso ao nascer. No entanto, PPD e CAL nem sempre refletem a inflamação do tecido periodontal atual. Consideraram ser apropriado o índice de sangramento na sondagem (BOP) como indicador de inflamação periodontal. Estes recrutaram 203 gestantes (idade média de $31,8 \pm 4,5$ anos), incluindo 20 pacientes com

inflamação periodontal e 183 controles com periodonto saudável.

Parâmetros de crescimento fetais, bem como condições periodontais foram registradas. A idade gestacional perinatal foi de $39,4 \pm 1,3$ semanas; 8 tiveram crianças pré-termo e 12 tiveram criança com baixo peso ao nascer. Os resultados da análise de regressão múltipla stepwise indicaram que o comprimento ao nascimento apresentou correlação negativa com o BOP% ($\beta = -0,175$, $p = 0,002$). Os parâmetros de comprimento do fêmur ao nascimento e do peso das crianças das mães com inflamação periodontal baixa foram significativamente maiores do que daqueles dentre as mães com inflamação periodontal alta ($p < 0,05$). A taxa de BPN no grupo com inflamação periodontal elevada era significativamente maior do que no grupo de baixa inflamação periodontal ($p < 0,05$). Takeuchi et al.,⁴⁷, em estudos que buscaram verificar se o grau de tratamento da doença periodontal tem sido entendido como uma medida preventiva. Neste sentido, Polyzos et al.,⁴⁸ utilizaram a técnica da raspagem e alisamento da raiz dos dentes afetados durante a gravidez, na tentativa de uma associação com redução de partos prematuros, porém o procedimento não mostrou-se como uma forma eficiente para esta redução. Corroborado por Rosa et al.,⁴⁹, que demonstrou em estudo, que o tratamento periodontal de rotina durante a gravidez não pode ser considerado como eficaz na redução da incidência de parto prematuro e do baixo peso ao nascer. Porém, Pimentel et al.,³² em estudo de revisão de literatura por meio da busca de artigos da base Medline/ Pub med, escritos em inglês, entre 1998 a 2009 constatarem diferentes resultados e concluíram no artigo proposto, que a maioria dos estudos em que foi empregado o tratamento periodontal não cirúrgico, reduzia a incidência de bebês prematuros e com baixo peso. Estudos envolvendo tratamentos não cirúrgicos no segundo trimestre da gestação foram propostos por Oliveira et al.,⁵⁰, mas estes não observaram redução de risco de parto prematuro ou de baixo peso ao nascer.

Boutin et al.,⁵¹, nesta mesma linha, por meio de estudos randomizados, com mulheres submetidas a tratamento periodontal e outras sem nenhum tipo de tratamento, não apresentaram redução significativa de parto prematuro. Todavia, houve uma heterogeneidade considerável entre os estudos, que poderia ser explicada pelo risco de polarização, o nível de rendimento, ou pelo uso de bochechos de clorexidina como uma co-intervenção nesta pesquisa. Não obstante, o uso diário de bochechos com clorexidina foi associado com a redução de parto prematuro e com a heterogeneidade moderada entre os cinco estudos incluídos. A clorexidina utilizada para bochechos como agente preventivos deve ainda ser objeto de mais avaliações. Konopka e Paradowska-Stolarz⁵², em estudo na Polônia, realizaram uma meta análise, correspondente a 15 estudos de caso controle, 1 estudo prospectivo e 6 estudos de coorte sobre a influência da periodontite na prematuridade e baixo peso ao nascer. Estes ensaios, provenientes de 4 continentes (Europa= 8; América do Sul = 7; América do Norte = 4; Ásia = 3), envolveram 12.047 mulheres gestantes. O odds-ratio global que relacionava nascimento prematuro, baixo peso ao nascer para as mães com periodontite, no modelo de efeitos aleatórios foi de 2,35 (1,88-2,93, $p<0,0001$). Para baixo peso ao nascer, foi de 1,5 (95% CI: 1,26 -1,79, $p=0,001$) e para partos prematuros foi -2,73 (95% CI: 2,06 -3,6, $p<0,0001$). Frente aos resultados sugeriram estudos, considerando a hipótese da periodontite como fator independente de nascimento prematuro e baixo peso ao nascer.

CONCLUSÃO

É fato que a doença periodontal ainda se traduz como um dos principais problemas de saúde bucal nos continentes, principalmente em países onde a promoção e a prevenção ainda não foram completamente incorporadas como medida de caráter coletivo e individual. A pluralidade dos fatores que a determinam caracteriza a complexidade, envolvendo uma microbiota variada, com micro-

organismos distintos quanto aos fatores de virulência. A *actynomicetencomitans* e *P.gingivalis* pertencem à microflora e ambas estão relacionadas com a doença periodontal em diferentes estágios, apresentando características que as colocam no interesse médico-científico direto, considerando-se as toxinas produzidas, bem como as leucotoxinas da *A. actynomicetencomitans* e as enzimas proteolíticas da *Phorphyromonas gingivalis*. Estas, em situações específicas apresentam-se como patógenos de envolvimento sistêmico ligados à gravidez e à prematuridade. No Brasil, o nascimento prematuro é um problema configurado e a análise dos fatores de risco tem sido apontada pelos pesquisadores como prioritária, potencializada pelo fato de que nestes fatores de risco estão envolvidas as gestantes erroneamente classificadas como de baixo risco. Uma das alternativas relacionadas a medidas preventivas e de operacionalidade na prática, seria o tratamento preventivo odontológico em todas as mulheres grávidas. Alguns estudos já trazem esta afirmação verdadeiramente pela redução dos bebês prematuros e baixo peso ao nascer. Todavia, ainda não existem estudos conclusivos sobre a relação que determinem a ocorrência de partos prematuros por esta causa específica, como também sobre benefícios diretos em relação ao tratamento preventivo periodontal como fator profilático da prematuridade. Portanto, sugere-se no presente trabalho a intensificação do desenvolvimento de mais pesquisas e estudos de referência, considerando-se o estouro da produção bibliográfica mundial atual neste sentido. O estudo prévio aqui apresentado integra a estruturação teórica da tese da pesquisadora 1 que por meio de estudo clínico em curso, busca estabelecer a relação da doença periodontal e a prematuridade.

REFERÊNCIAS

- 1- Grigoriadou ME, Koutayas SO, Madianos PN, Strub JR. Interleukin-1 as a genetic marker for periodontitis: review of the literature. **Quintessence Int.** 2010 Jun;41(6):517-25.
- 2- Standar K, Kreikemeyer B, Redanz S, Münter WL, Laue M, Podbielski A. Setup of an in vitro test system for basic studies on biofilm behavior of mixed-species cultures with dental and periodontal pathogens. **PLoS One.** 2010 Oct 1;5(10).
- 3- Mc Nicol A, Israels SJ. Mechanisms of oral bacteria-induced platelet activation. **Can J Physiol Pharmacol.** 2010 May;88 (5):510-24.
- 4- Goulart R de C, Bolean M, Paulino Tde P, Thedei G JR, Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Photomed Laser Surg.** 2010 Aug;28 Suppl 1:S53-60.
- 5- Roman-torres, C.V.G, Aquino, D.R, Cortelli, S.C, Franco, G.C.N, Santos, J.G, Corraini,P, Holzhausen, M, Diniz, M.G, Gomez, R.S, Cortelli, J.R. Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis Brazilian subjects. **Archives of oral biology** .55(2010), 242-248.
- 6 - Cortelli JR, Roman-torres CV, Aquino DR, Franco GC, Costa FO, Cortelli SC. Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Brazilians with chronic periodontitis. **Braz Oral Res.** 2010 Apr-Jun;24(2):217-23.
- 7- Doğan B, Kipalev AS, Okte E, Sultan N, Asikainen SE. Consistent intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* despite clonal diversity. **J Periodontol.**2008 Feb;79 2):307-15.
- 8- Kachlany, S.C. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from th-reat to therapy. **J Dent Res.** 2010.Jun;89 (6): 561-570.
- 9- Brage, M; Holmlund, A; Johansson, A. Humoral immune response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. **J Periodontal Res.** 2011 Apr;46(2):170-5.
- 10- Ando ES, De-gennaro LA, Faveri M, Feres M, Dirienzo JM, Mayer MP. Immune response to cytolethal distending toxin of *Aggregatibacteractinomycetemcomitans* in periodontitis patients. **J Periodontal Res.** 2010 Aug;45(4):471-80.
- 11- Gaetti-jardim E JR, Wahasugui TC, Tomazinho PH, Marques MM, Nakano V, Avila-Campos MJ. Distribution of biotypes and leukotoxic activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from Brazilian patients with chronic periodontitis. **Braz J Microbiol.** 2008 Oct;39(4):658-63.
- 12- Mayer MP, Bueno LC, Hansen EJ, Dirienzo JM. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect Immun,** 1999.Mar;67(3):1227-37.
- 13- Claesson. R, Lagervall, M, Höglund-Aberg, C, Johansson, A, Haubek, D. Detection of the highly leucotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in members of a Caucasian family living in Sweden...**J Clin Periodontol.** 2011. Feb; 38 (2):115-21.
- 14- Sakellari, D, Katsikari, A, Slini, T, Ioannidis, I, Konstantinidis, A, Arsenakis, M. Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the JP2 clone in a Greek population. **J Clin Periodontol.** 2011 Feb;38(2):108-14.
- 15 - Yang, C.Y, Wang, H.C, Li, J.M, Wang, J,Y, Yang, K.C, Ho, Y.K, Lin, P.Y, Lee, L.N, Yu, C.J, Yang, P.C, Hsueh, P.R. Invasive infections of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. **J Microbiol Immunol Infect.** 2010 Dec; 43(6):491-7.
- 16- Meuric, V, Rouillon, M.V, Chandad,F, Bonnaure-Mallet M. Putative respiratory chain of *Porphyromonas gingivalis*. **Future Microbiology.** 2010, may; 5(5), 717-34.

- 17- Boisvert H, Duncan MJ. Translocation of *Porphyromonas gingivalis* gingipain adhesin peptide A44 to host mitochondria prevents apoptosis. **Infect Immun.** 2010 Aug;78(8):3616-2
- 18- Groeger S, Doman E, Chakraborty T, Meyle J. Effects of *Porphyromonas gingivalis* infection on human gingival epithelial barrier function in vitro. **Eur J Oral Sci.** 2010 Dec;118 6):582-9.
- 19- Shaik-Dasthagirisahab, Y.B, Kantarci A, Gibson, F.C . Immune response of macrophages from young and aged mice to the oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis*. **Immun Ageing.** 2010 Nov 29;7:15.
- 20- Wang, Q, Zhou, X.D, Zheng, Q.H, Wang, Y, Tang, L, Huang, D.M. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in chronic apical periodontitis associated with symptoms. **J Endod.** 2010 Nov;36 (11):1790-5.
- 21- Bainbridge B, Verma RK, Eastman C, Yehia B, Rivera M, Moffatt C, Bhattacharyya I, Lamont RJ, Kesavalu L. Role of *Porphyromonas gingivalis* phosphoserine phosphatase enzyme SerB in inflammation, immune response, and induction of alveolar bone resorption in rats. **Infect Immun.** 2010 Nov;78(11):4560-9.
- 22- Grenier, D, LA, V.D. Proteases of *Porphyromonas gingivalis* as important virulence factors in periodontal disease and potential targets for plant-derived compounds: a review article. **Curr Drug Targets.** 2011 Mar 1;12 (3):322-31.
- 23 - Shoji M, Yoshimura A, Yoshioka H, Takade A, Takuma Y, Yukitake H, Naito M, hara Y, Yoshida S, Nakayama K. Recombinant *Porphyromonas gingivalis* FimA preproprotein expressed in *Escherichia coli* is lipidated and the mature or processed recombinant FimA protein forms a short filament in vitro. **Can J Microbiol.** 2010 Nov;56(11):959-67.
- 24 - Dashper SG, Pan Y, Veith PD, Chen YY, Toh EC, Liu SW, Cross KJ, Reynolds EC. Lactoferrin inhibits *Porphyromonas gingivalis* proteinases and has sustained biofilm inhibitory activity. **Antimicrob Agents Chemother.** 2012 Mar;56(3):1548-56.
- 25- Yamaguchi, M, Sato, K, Yukitake, H, Noiri, Y, Ebisu, S, Nakayama ,K. A. *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative glycosyltransferase exhibits defective biosynthesis of the polysaccharide portions of lipopolysaccharide, decreased gingipain activities. **Infect Immun.** 2009 Oct;78(10):4151-6.
- 26- Zaric S, Shelburne C, Darveau R, Quinn DJ, Weldon S, Taggart CC, Coulter WA. Impaired immune tolerance to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide promotes neutrophil migration and decreased apoptosis. **Infect Immun.** 2010 Oct;78(10):4151-6.
- 27- Brunner J, Wittink FR, Jonker MJ, De jong M, Breit TM, Laine ML, De soet JJ, Crielaard W. The core genome of the anaerobic oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis*. **BMC Microbiol.** 2010 Sep 29;10:252.
- 28- Stathopoulou PG, Galicia JC, Benakanakere MR, Garcia CA, Potempa J, KINANE DF. *Porphyromonas gingivalis* induce apoptosis in human gingival epithelial cells through a gingipain-dependent mechanism. **BMC Microbiol.** 2009. May 27;9:107.
- 29- Röhrner, E, Detert, J, Kolar, P, Hocke, A, N'guessan, P, Matziolis, G; Kanitz, V, Bernimoulin, J.P, Kielbassa, A, Burmester, G.R, Buttgereit, F, Pischon, N. Induced apoptosis of chondrocytes by *Porphyromonas gingivalis* as a possible pathway for cartilage loss in rheumatoid arthritis. **Calcif Tissue Int.** 2010 Oct;87(4):333-40.
- 30- Wakabayashi H, Kondo I, Kobayashi T, Yamauchi K, Toida T, Iwatsuki K, Yoshie H. Periodontitis, periodontopathic bacteria and lactoferrin. **Biometals.** 2010 Jun;23(3):419-24.

- 31- Okada, Y, Hamada, N, Kim, Y, Takahashi, Y, Sasaguri .K, Ozono, S, Sato, S. Blockade of sympathetic beta-receptors inhibits *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in an experimental rat periodontitis model. **Arch Oral Biol.** 2010.
- 32- Pimentel Lopes de Oliveira GJ, Amaral Fontanari L, Chaves de Souza JA, Ribeiro Costa M, Cirelli JA. Effect of periodontal treatment on the incidence of preterm delivery: a systematic review. **Minerva Stomatol.** 2010 Oct;59(10):543-50.
- 33- Inaba H, Amano A. Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases--from molecular mechanisms to clinical cases: Implication of periodontal diseases in development of systemic diseases. **J Pharmacol Sci.** 2010;113(2):103-9. Epub 2010 May 24.
- 34 - Gonzales-Marin C, Spratt DA, Millar MR, Simmonds M, Kempley ST, Allaker RP. Levels of periodontal pathogens in neonatal gastric aspirates and possible maternal sites of origin. **Mol Oral Microbiol.** 2011 Oct;26(5):277-90.
- 35 - Shanthi, V, Vanka, A, Bhambal, A, Saxena, V, Saxena, S, Kumar, S.S. Association of pregnant women periodontal status to preterm and low-birth weight babies: A systematic and evidence-based review. **Dent Res J (Isfahan).** 2012 Jul;9(4):368-80.
- 36 - Africa, C.W, Kayitenkore, J, Bayingana, C. Examination of maternal gingival crevicular fluid for the presence of selected periodontopathogens implicated in the pre-term delivery of low birthweight infants. **Virulence.** 2010. Jul-Aug; 1(4):254-9.
- 37- Slots J, Kamma JJ. General health risk of periodontal disease. **Int Dent J.** 2001 Dec;51 (6):417-27.
- 38- Sert, T, Kirzioğlu, F.Y, Fentoğlu, O, Aylak, F, Mungan, T. Serum placental growth factor, vascular endothelial growth factor, soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2 levels in periodontal disease, and adverse pregnancy outcomes. **J Periodontol.** 2011 Dec;82(12):1735-48
- 39 - Chakki, B. A, Ealla, K.R, Hunsingi, P, Kumar, A. .Influence of maternal periodontal disease as a risk factor for low birth weight infants in Indian population. **J Contemp Dent Pract.** 2012. Sep 1;13 (5):676-80.
- 40 - Li Y, Shibata Y, Zhang L, Kuboyama N, Abiko Y. Periodontal pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS induces mitochondria-dependent-apoptosis in human placental trophoblasts. **Placenta.** 2011 Jan;32(1):11-9.
- 41- Ali, T.B, Abidin, K. Z. Relationship of periodontal disease to pre-term low birth weight infants in a selected population - a prospective study. **Community Dent Health.** 2012. Mar; 29 (1):100-5.
- 42 - Vogt M, Sallum AW, Cecatti JG, Morais SS.. Periodontal disease and some adverse perinatal outcomes in a cohort of low risk pregnant women. **Reprod Health** 2010 Nov 3;7:29.
- 43 - Swati P, Thomas B, Vahab SA, Kapaettu S, Kushtagi P. Simultaneous detection of periodontal pathogens in subgingival plaque and placenta of women with hypertension in pregnancy. **Arch Gynecol Obstet.** 2012 Mar;285(3):613-9.
- 44- Hasegawa-Nakamura K, Tateishi F, Nakamura T, Nakajima Y, Kawamata K, Douchi T, Hatae M, Noguchi K.. The possible mechanism of preterm birth associated with periodontopathic *Porphyromonas gingivalis* **J Periodontal Res.** 2011 Aug;46(4):497-504.
- 45- Haje, Oh KJ, Yang HJ, Jun JK, Jin BH, Paik DI, Bae KH. Oral health behaviors, periodontal disease, and pathogens in preeclampsia: a case-control study in Korea. **J Periodontol.** 2011 Dec;82(12):1685-92.
- 46- Avila WS, Timerman L, Romito GA, Marcelino SL, Neves IL, Zugaib M, Grinberg M. Periodontal disease in pregnant patients with rheumatic valvular disease: clinical and microbiological study. **Arq Bras Cardiol.** 2011 Apr;96(4):307-11.

- 47- Takeuchi N, Ekuni D, Irie K, Furuta M, Tomofuji T, Morita M, Watanabe T. Relationship between periodontal inflammation and fetal growth in pregnant women: a cross-sectional study.. **Arch Gynecol Obstet**. 2013 May;287(5):951-7
- 48 - Polyzos, N.P, Polyzos, I.P, Zavos, A, Valachis, A, Mauri, D, Papanikolaou, E.G, TZIORAS, S, Weber, D, Messinis, I.E. Obstetric outcomes after treatment of periodontal disease during pregnancy: systematic review and meta-analysis **BMJ**. 2010 Dec 29;341: c7017.
- 49- Rosa MI, Pires PD, Medeiros LR, Edelweiss MI, Martínez-Mesj. Periodontal disease treatment and risk of preterm birth: a systematic review and meta-analysis. **Cad Saude Publica**. 2012 Oct;28(10):1823-33.
- 50 - Oliveira, A.M, Oliveira, P.A, Cota, L.O, Magalhães, C.S, Moreira, A.N, Costa, F.O. Periodontal therapy and risk for adverse pregnancy outcomes. **Clin Oral Investig**. 2011 Oct;15 (5):609-15.
- 51- Boutin, A, Demers, S, Roberge, S, Roy-Morency, A, Chandad, F, Bujold, E. Treatment of Periodontal Disease and Prevention of Preterm Birth: Systematic Review and Meta-analysis. **Am J Perinatol**. 2012, Dec 27.
- 52- Konopka, T, Paradowska-Stolarz, A. Periodontitis and risk of preterm birth and low birthweight-a meta-analysis. **Ginekol Pol**. 2012 Jun; 83 (6).