

UNIVERSIDADE DE UBERABA

CURSO DE ODONTOLOGIA

**ISABELLA CORRÊA SIQUEIRA
NIBYCIA LORRANNY DE ARAUJO DAMASO**

**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA *Porphyromonas gingivalis* EM
AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO DE GESTANTES COM
DOENÇA PERIODONTAL.**

UBERABA-MG

2018

UNIVERSIDADE DE UBERABA
ISABELLA CORRÊA SIQUEIRA
NIBYCIA LORRANNY DE ARAUJO DAMASO

**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA *Porphyromonas gingivalis* EM
AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO DE GESTANTES COM
DOENÇA PERIODONTAL.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentando para a Universidade de Uberaba como parte dos requisitos da Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, para obtenção do título de Graduação em Odontologia.

Orientador (a): Prof.a Dr. Ruchele Dias
Nogueira Geraldo Martins

UBERABA-MG

2018

S75i Siqueira, Isabella Corrêa.
Investigação da presença *Porphyromonas gingivalis* em amostras de líquido amniótico de gestantes com doença periodontal / Isabella Corrêa Siqueira, Nibycia Lorranny de Araujo Damaso. – Uberaba, 2018.
39 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso -- Universidade de Uberaba. Curso de Odontologia, 2018.

Orientadora: Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins.

1. Periodontite. 2. *Porphyromonas gingivalis*. 3. Gravidez. 4. Líquido amniótico. I. Damaso, Nibycia Lorranny de Araujo. II. Martins, Ruchele Dias Nogueira Geraldo. III. Universidade de Uberaba. Curso de Odontologia. IV. Título.

CDD 617.632

Ficha elaborada pela bibliotecária Tatiane da Silva Viana CRB6-3171


UNIVERSIDADE DE UBERABA
ISABELLA CORRÊA SIQUEIRA
NIBYCIA LORRANNY DE ARAUJO DAMASO

INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA *Porphyromonas gingivalis* EM
AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO DE GESTANTES COM
DOENÇA PERIODONTAL.

Manuscrito apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de
Cirurgião-Dentista do Curso de Graduação em Odontologia da Universidade
de Uberaba.


Aprovada em: 08 /12/2018

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr^a. Ruchele Dias Nogueira Geraldo-Martins

Universidade de Uberaba



Prof. Dr^a. Sanívia Aparecida de Lima Pereira

Universidade de Uberaba

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus por ter me abençoado e ter me dado a oportunidade de trilhar esta jornada. A minha mãe, Eliene Candida de Araújo pela força e confiança que mesmo distante, me transmitiu desde o início, apoiando em todas minhas decisões e passos, sendo todo o meu suporte diário. Aos meus tios, Elaine Cristina de Araújo Rodriguez e Ubirajara César Rodriguez que sempre estiveram comigo dando força para realizar meu sonho, e a minha avó, Rosalha Bueno De Oliveira que me dedicou tempo e atenção, me acalmando nos momentos de desespero. A estes todo meu agradecimento por me passarem confiança e a força para seguir em frente nos estudos, especialmente nos momentos mais difíceis. Amo vocês!

Atenciosamente, Nibycia.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por me conceder a sabedoria, paciência e os dons necessários para concluir esta etapa em minha vida. À minha família, aos meus pais, Iolivan Corrêa e Maria da Penha Pires Siqueira por todo o empenho, apoio e por todos os sacrifícios que fizeram para que este meu sonho se realizasse. Ao meu irmão Iolivan Corrêa Siqueira Junior que sempre acreditou em mim e esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins da graduação. Amo vocês!

Atenciosamente, Isabella.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter nos dado força para nos dedicarmos a este curso e por nunca nos desamparar.

Aos nossos familiares por terem lutado e nos apoiado, ajudando-nos a realizar este sonho.

À Universidade de Uberaba, por nos proporcionar os meios necessários para que pudéssemos concluir este nosso sonho e pelo ensino de excelência.

A todos os professores que passaram por nós nestes anos de graduação, por nos apresentarem a Odontologia de forma competente e apaixonante, por nos motivarem a ser melhores a cada momento e superar nossas limitações.

Aos funcionários da instituição que sempre estiveram à disposição, para que nada nos faltasse.

A Prof.^a Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins, nossa orientadora e amiga, por toda a atenção, apoio, confiança, dedicação que teve conosco, e o cuidado de nos orientar a todo o momento com competência para realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a nossa formação, o nosso muito obrigada.

RESUMO

Há evidências de que vários micro-organismos possam ser transferidos de mães para filhos durante a vida intrauterina. No entanto, pouco se sabe sobre a transferência de micro-organismos orais durante a gestação, especialmente no líquido amniótico, que é o biofluido deglutido pelo feto. Sabendo-se que as doenças periodontais (gingivite e periodontites) são manifestações comuns nas gestantes e que *Porphyromonas gingivalis* é a principal bactéria associada a essas doenças, é objetivo do presente estudo é avaliar a presença dessa bactéria em amostras de líquido amniótico e saliva materna e comparar com a presença ou não da doença periodontal. Para tanto, 27 amostras de líquido amniótico foram coletadas durante o parto. No dia seguinte, estas mulheres foram entrevistadas, avaliadas oralmente, por exame clínico intra-oral, e amostras salivares foram coletadas por sucção com pipetas Pasteur. As amostras foram transportadas para o laboratório em gelo e submetidas à extração do material genético com kit de extração de DNA Powerlyser. Após quantificação do material extraído, foram realizados os ensaios de PCR com primers específicos para *P. gingivalis*. Os resultados mostraram que grande parte das gestantes submetidas a essa pesquisa, apresentaram sangramento gengival durante a sondagem, porém, é uma manifestação bastante comum durante o período gravídico, pois estas gestantes estão suscetíveis a variações hormonais como o aumento do estrogênio e da progesterona que diminuem a barreira epitelial, e aumentam a permeabilidade vascular, respectivamente, além de gerar o acúmulo de biofilme nessa região, causando problemas no periodonto das mesma. Grande parte, das amostras salivares de pacientes saudáveis ou pacientes com gingivite, possuíam a presença da bactéria Pg, não houve diferença estatisticamente significantes ($p < 0,05$). A presença de Pg no LA em casos de gestantes com gingivite é comum, visto que tecidos gengivais inflamados, onde o epitélio é ulcerado e o tecido conjuntivo adjacente é altamente vascularizado o que o torna mais fácil a entrada destes micro-organismos na circulação, possibilitando melhor acesso destes no sangue, podendo seguir posteriormente para a placenta contrapondo a ideia que o ambiente intrauterino é livre de bactérias, ou que o feto adquire micro-organismos a partir da entrada no canal vaginal ou até mesmo em contato com a pele da mãe.

Palavras-Chave: Doença periodontal. Gravidez, *Porphyromonas gingivalis*, Líquido Amniótico, Saliva.

ABSTRACT

There is evidence that several microorganisms can be transferred from mother to child during intrauterine life. However, little is known about the transfer of oral microorganisms during gestation, especially in the amniotic fluid, which is the biofluid swallowed by the fetus. It is known that periodontal diseases (gingivitis and periodontitis) are common manifestations in pregnant women and that *Porphyromonas gingivalis* is the main bacterium associated with these diseases, it is the objective of the present study to evaluate the presence of this bacterium in samples of amniotic fluid and maternal saliva and to the presence or absence of periodontal disease. For this, 27 samples of amniotic fluid were collected during labor. The following day, these women were interviewed, evaluated orally, by intra-oral clinical examination, and salivary samples were collected by suctioning with Pasteur pipettes. The samples were transported to the laboratory on ice and subjected to extraction of the genetic material with Powerlyser DNA extraction kit. After quantification of the extracted material, the PCR tests were carried out with primers specific for *P. gingivalis*. The results showed that a large part of the pregnant women presented gingival bleeding during the probing, but it is a very common manifestation during the pregnancy period, since these pregnant women are susceptible to hormonal variations such as the increase of estrogen and progesterone that decrease the epithelial barrier, and increase the vascular permeability, respectively, besides generating the accumulation of biofilm in this region, causing problems in the periodontium of the same. Most of the salivary samples from healthy patients or patients with gingivitis had the presence of Pg bacteria. There were no statistically significant differences ($p < 0.05$). The presence of Pg in LA in cases of pregnant women with gingivitis is common, since inflamed gingival tissues, where the epithelium is ulcerated and adjacent connective tissue is highly vascularized, making it easier for these microorganisms to enter the circulation, better access of these in the blood, and can follow later to the placenta opposing the idea that the intrauterine environment is free of bacteria, or that the fetus acquires microorganisms from the entrance into the vaginal canal or even in contact with the mother's skin.

Key Words: Periodontal disease, Pregnancy, *Porphyromonas gingivalis*., Amniotic liquid. Saliva

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Apresentação do gene, orientação, sequência dos pares de bases e números de bases dos oligonucleotídeos	17
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Representação esquemática do processo de extração do DNA cromossomal kit PowerLyzer® PowerSoil DNA Isolation	16
FIGURA 2- StepOne™ Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific	18
FIGURA 3- Curva de Melting. Representação da especificidade da reação	19
GRÁFICO 1- Porcentagem de mulheres com gengivite, periodontite e sem doença periodontal no momento da coleta amostral	20
GRÁFICO 2- Porcentagem de mulheres que apresentaram ou não sangramento gengival, biofilme calcificado e profundidade de sondagem > que 4 mm	21
GRÁFICO 3- Frequência de amostras de saliva (SA) com presença ou não de <i>Porphyromonas gingivalis</i> entre as mulheres com gengivite, periodontite e saudável	22
GRÁFICO 4- A presença da <i>Porphyromonas gingivalis</i> em amostras de saliva (SA) de gestantes com ou sem gengivite em porcentagem de pacientes	23
GRÁFICO 5- A presença da <i>Porphyromonas gingivalis</i> em amostras de LA (líquido amniótico) de gestantes com ou sem gengivite em porcentagem de pacientes	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	10
2 HIPÓTESE	12
3 OBJETIVO	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Delineamentos do estudo e critérios de seleção	14
4.2 Exame Clínico intra-oral	14
4.3 Coletas amostrais	15
4.4 Detecção de Pg nas amostras biológicas	15
4.4.1 Extração de DNA cromossomal bacteriano	15
4.4.2 Quantificação do DNA extraído	17
4.4.3 PCR quantitativo das amostras	17
4.4.4 Análises estatísticas	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6 CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXOS	36

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Doença Periodontal é considerada como uma infecção das estruturas de suporte dos dentes e é ocasionada pela presença de altos níveis de bactérias gram-negativas que se acumulam formando o biofilme dental no tecido periodontal, podendo levar à alteração da arquitetura do mesmo (Petersen & Ogawa, 2005). O biofilme microbiano se acumula ao redor dos dentes e penetra dentro do sulco gengival (Socransky & Haffajee, 1992). As doenças periodontais mais prevalentes e extensivamente investigadas são a gengivite induzida por biofilme bacteriano, e a periodontite crônica, um processo inflamatório que se estende às estruturas periodontais de suporte. Define-se gengivite como inflamação reversível confinada à gengiva iniciada por bactérias do biofilme microbiano que se forma nos dentes e na gengiva.

Actinobacillus actinomycetemcomitans, *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Tannerella forsythensis* estão entre as espécies bacterianas do biofilme subgengival que demonstraram maior relevância etiológica na iniciação e progressão da doença periodontal (Lamont & Jenkinson 1998, Wang et al., 2013). *Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria anaeróbia estrito presente em diversas formas de doença periodontal. A sua patogenicidade está dependente de fatores de virulência, tais como fímbrias, lipopolissacarídeos, produção de toxinas, que resulta na lesão tecidual através de sua colonização da placa subgengival. Seu habitat natural é a cavidade oral e, por não ser capaz de sobreviver por longos períodos no meio ambiental, a transmissão entre pessoas é a forma mais provável de contaminação (Lamont & Jenkinson 1998).

Tem-se observado a relação da doença periodontal e possíveis fatores de risco, como tabagismo e condições sistêmicas específicas, como diabetes, problemas cardiovasculares, parto prematuro (Williams & Offenbacher, 2000) e gestação. A partir do início da fecundação, há várias mudanças hormonais na mulher, como o aumento do estrogênio e progesterona. Segundo a *American Academy of Periodontology* (2000), alterações dos níveis destes hormônios podem causar problemas diretos no periodonto da mulher (Eriksen et al., 1988), como quadros de hiperplasia gengival, gengivite gravídica e granuloma piogênico (Guncu et al., 2005; Ramos et al., 2016). A gengivite é considerada a mais comum durante a gravidez e podem variar de inflamação leve a uma hiperplasia grave, dor e sangramento. A gengivite induzida por biofilme microbiano é uma inflamação da gengiva resultante da infecção bacteriana, e é a doença periodontal mais comum em mulheres grávidas. O estrogênio é o responsável pela redução da barreira epitelial no periodonto, o que torna susceptível a problemas periodontais (Davenport et al., 1998, Klokkevold et al., 2002). Já a progesterona

tem ação vasodilatadora nos microvasos gengivais, elevando a permeabilidade vascular estimulando assim a prostaglandinas e leucócitos polimorfonucleares no fluido gengival (Elattar, 1976).

É clara a associação entre a periodontite e o desenvolvimento de parto prematuro e já foram identificados patógenos periodontais como *Fusobacterium nucleatum* no líquido amniótico de mulheres que tiveram partos prematuros (Bearfield et al., 2002) e também a presença de *P. gingivalis* na placenta e no cordão umbilical (Blanc et al., 2015; Vanterpool et al., 2016). No entanto, há necessidade de se investigarem estes micro-organismos em condições leves como a gengivite, que é bem comum durante a gestação e na ausência da doença. Há evidências clínicas e laboratoriais que mostram que há micro-organismos na placenta, sangue do cordão umbilical, líquido amniótico e mecônio em gestações a termo, sem infecções evidentes (Stout et al., 2013; Aagaard et al., 2014). As fortes evidências de influxo microbiano entre mãe e filho suscitam diversas discussões a respeito da transferência de micro-organismos comensais detectáveis na mãe para o feto, como, por exemplo, os que residem na cavidade bucal.

Recentemente foram encontrados *Streptococcus mutans* (Mendes et al., 2018) e *Porphyromonas gingivalis* (Curi, 2017) em amostras de sangue do cordão umbilical de gestantes de boa saúde geral e sem doenças orais, mostrando que os micro-organismos comumente encontrados na cavidade oral podem ser naturalmente transferidos de mãe para filho, como uma fonte de antígenos microbianos com a provável função de estimulador do desenvolvimento do sistema imune do feto. Uma vez que o feto deglute o líquido amniótico durante a vida intrauterina, os seus componentes representam as fontes de estimulação e nutrição fetal.

Diante do exposto, a investigação dos micro-organismos presentes no líquido amniótico poderá contribuir para o entendimento da estimulação fetal e também a colonização oral precoce em crianças.

2 HIPÓTESE

A hipótese do estudo é a de que gestantes com doença periodontal apresentem uma maior frequência de amostras de líquido amniótico e saliva com Pg detectável.

3 OBJETIVO

O objetivo deste projeto será o de avaliar a presença de *Porphyromonas gingivalis* em amostras de líquido amniótico (LA) e salivas (SA) de gestantes doentes periodontalmente.

Os objetivos específicos incluem:

- Detectar Pg em amostras de LA e SA;
- Comparar a presença de Pg em gestantes com e sem gengivite e ou periodontite;
- Comparar a presença de Pg na saliva e no líquido amniótico;
- Comparar os dados laboratoriais com informações de higiene das gestantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamentos do estudo e critérios de seleção

Um total de 27 amostras de LA e SA foi incluído neste estudo, provenientes de um grupo de gestantes que participaram de um amplo estudo realizado na Universidade de Uberaba e na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética da UNIUBE (Anexo 1) e que assinaram o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). Os critérios de inclusão para seleção amostral incluíram gestantes saudáveis com indicação de partos a termo que foram realizados na Maternidade do Mário Palmério Hospital Universitário (MPHU), sem história ou presença de doença sistêmica, com idade entre 18-38 anos, com gravidez sem intercorrências, não usuária de tabaco, álcool ou drogas, não utilizando corticoides ou antibióticos, possuindo mais de 20 dentes. Estas gestantes elegíveis foram entrevistadas no dia seguinte após o parto e dados socioeconômicos, hábitos de higiene oral, visitas ao dentista, entre outras informações foram obtidas. (Anexo 2).

4.2 Exame Clínico intra-oral

As gestantes foram submetidas a um exame clínico intra-oral para avaliação e detecção de doenças orais, como cárie e doença periodontal, no dia seguinte após o parto. Os exames foram realizados por cirurgiões dentistas treinados e capacitados para a detecção da doença periodontal e cárie. No exame da condição periodontal foram medidas profundidade de sondagem de sulco/bolsa, recessão gengival e obtidos os valores de nível/perda de inserção clínica. Tais observações foram procedidas e registradas em seis diferentes locais (disto-vestibular, médio-vestibular, méso-vestibular, disto-lingual, médio-lingual, méso-lingual) para cada dente.

A gengivite foi considerada positiva quando havia presença de 25% ou mais de sítios com sangramento à sondagem e nenhum sítio com perda de inserção clínica > 2 mm (Gomes-Filho *et al.*, 2007). A periodontite foi considerada positiva quando a havia quatro ou mais dentes com um ou mais sítios com profundidade de sondagem ≥ 4 mm e perda de inserção de ≥ 3 mm, como descrito por Lopez et al (2002).

4.3 Coletas amostrais

As coletas de líquido amniótico foram realizadas por obstetras do MPHU após a assepsia e incisão cirúrgica. O LA foi coletado em seringas estéreis e transferido para tubos Falcon e imersos em gelo. As salivas não estimuladas foram obtidas pela sucção com pipetas estéreis Pasteur e colocadas em tubos eppendorfs, imersos em gelo, no dia seguinte após o parto. Após as coletas, as amostras foram transportadas em gelo e estocadas a -70°C no Laboratório de Biopatologia da UNIUBE. As amostras foram descongeladas para a execução dos ensaios propostos abaixo:

4.4 Detecção de Pg nas amostras biológicas

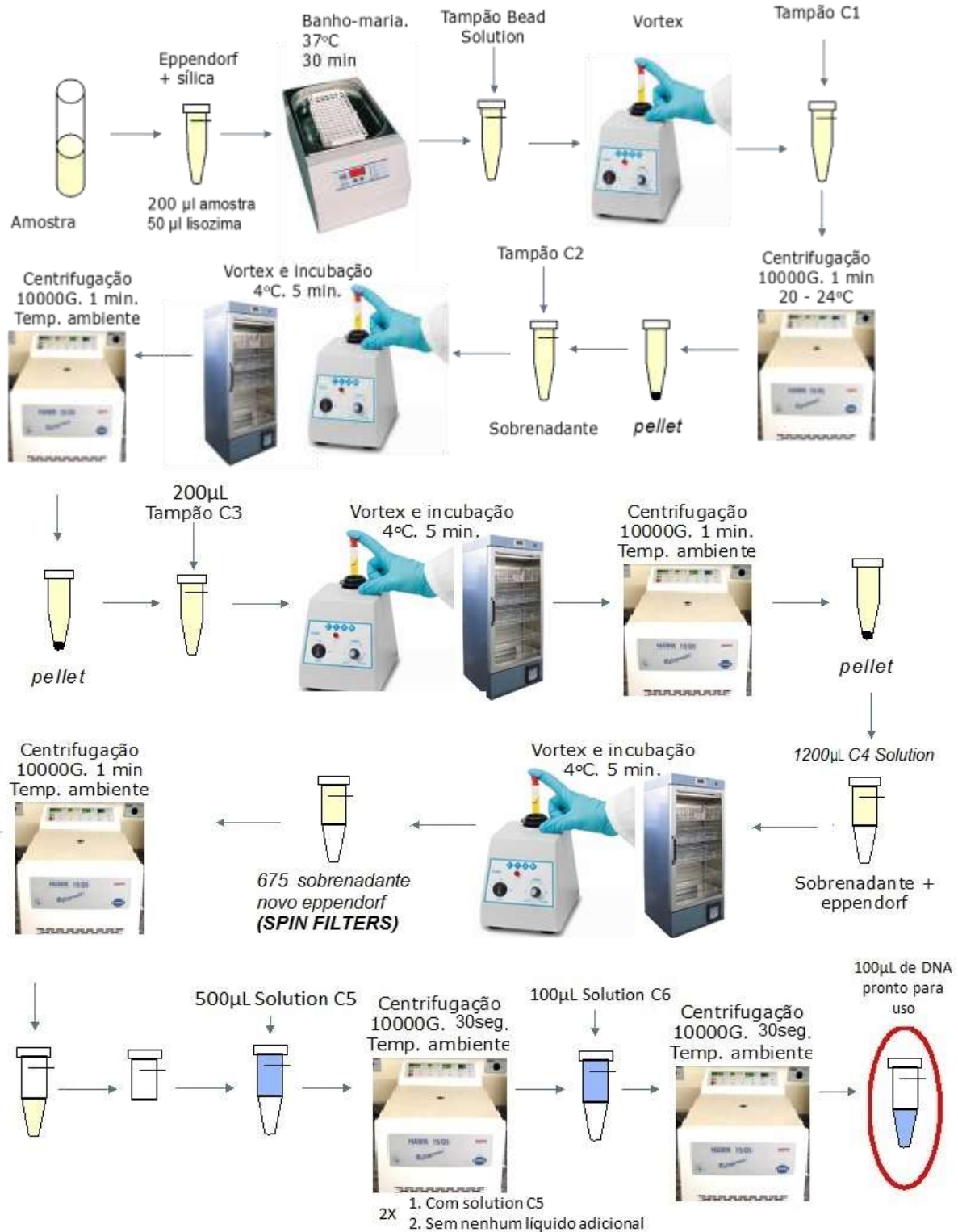
4.4.1 Extração de DNA cromossomal bacteriano

As amostras foram submetidas a extração do DNA de acordo com o protocolo do fabricante do kit PowerLyzer® PowerSoil DNA Isolation (PROMEGA, Carlsbad, CA) e conforme esquematizado na Figura 1. As amostras receberam $750\mu\text{L}$ de solução *bead* juntamente com mais $60\mu\text{L}$ da solução C1 e foram agitadas em vórtex para homogeneização e transferidas para centrifuga à 10.000 g por 30 segundos em temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo em que foi aplicado $250\mu\text{L}$ de solução C2 depois de aplicado a solução o mesmo foi submetido agitação e incubado a 4°C por 5 minutos. Após a centrifugação, em temperatura ambiente por 1 minuto a 10.000 g , foi retirado o sobrenadante e adicionado $200\mu\text{L}$ de solução C3. Em seguida, o eppendorf foi levado ao vórtex e incubado a 4°C por 5 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas em temperatura ambiente por 1 minuto a 10.000g .

Ao sobrenadante obtido foram adicionados $1200\mu\text{L}$ da solução C4 e o eppendorf foi levado por 5 segundos ao vórtex. Foram transferidos para um novo eppendorf (Spin Filter) $675\mu\text{L}$ do sobrenadante que se formou e o conteúdo foi levado à centrífuga a 10.000 g por 1 minuto para obtenção do sobrenadante. O volume filtrado foi desprezado, adicionaram $500\mu\text{L}$ da solução C5 e centrifugado à temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000g . Para finalização do processo, o eppendorf foi centrifugado sem nenhum líquido adicional, apenas contendo o material genético aderido à membrana, a fim de que o DNA bacteriano atravessasse o filtro. Após este passo, o conteúdo genético foi transferido para um novo eppendorf; em seguida, adicionados $100\mu\text{L}$ da solução C6 e levado a centrífuga em

temperatura ambiente a 10.000 g por 30 segundos. Depois da centrifugação, o filtro foi descartado, o material genético que atravessou a membrana foi preservado, restando ao final do processo 100µL de DNA pronto para uso.

FIGURA 1- Representação esquemática do processo de extração do DNA cromossomal kit PowerLyzer® PowerSoil DNA Isolation.



4.4.2 Quantificação do DNA extraído

Após a extração do DNA das amostras, foi realizada a quantificação de material genético extraído bem como seu grau de pureza. Para isso, 2 µL da amostra foram analisadas em Espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). A pureza das extrações das amostras foi considerada adequada quando razão entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm apresentarem valores entre 1.8 e 2.0. Para valores fora deste intervalo, as extrações foram descartadas e repetidas, já que valores maiores que este intervalo indica contaminação por RNA e abaixo sugerem a presença de proteínas (Sambrook et al., 1989).

4.4.3 PCR quantitativo das amostras

Os ensaios de PCR quantitativo foram realizados na Universidade Federal do Triângulo Mineiro. As amostras analisadas por PCR com dois iniciadores que asseguraram a reatividade e/ou negatividade, através da realização dos ensaios com DNA extraído de cepas de *P. gingivalis*, como controle positivo e água ultrapura livre de qualquer tipo de DNA, como controle negativo.

Para os experimentos, foram utilizados os primers de oligonucleotídeos para Pg (Exxtend Biotecnologia Ltda) demonstrado na Tabela 1.

TABELA 1- Apresentação do gene, orientação, sequência dos pares de bases e números de bases dos oligonucleotídeos.

<i>Gene</i>	<i>Orientação</i>	<i>Sequência</i>	<i>Nº de bases</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Forward</i>	5'AGCCATGCGCAATCAACAGGTT 3'	31
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Reverse</i>	3'CGCAACGCGAACATCTTGATCAG 5'	32

Os oligonucleotídeos foram previamente dissolvidos em TE 1X [10 mM tris-HCL. EDTA 1mM (pH 7.5-8.0)].

Para recriar as condições de transcriptase reversa “*in vitro*”, foi utilizado um mix, que continha: 6.5µL de 1X Sybreenmastermix (Roche), 1µL de cada primer (Tabela 1), 4.5µL de água ultrapura livre de DNA e 2µL de amostra de DNA cromossomal. Em seguida, este mix foi depositado em uma placa MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (MARCA,) que foi selada adequadamente, levada para um agitador “*speed*” de 2 segundos em 2 segundos colocada no termociclador.

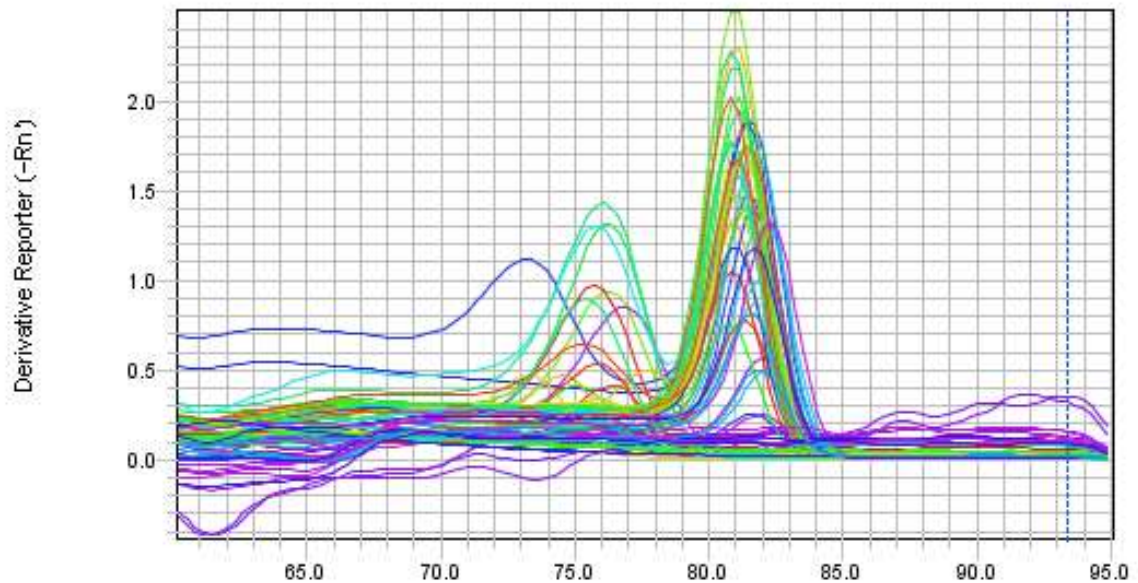
O termociclador utilizado (Figura 2) para realização da técnica foi programado para obter uma desnaturação do DNA a uma temperatura de 95°C por um período de 10 minutos, o anelamento ocorreu a 62°C por 20 segundos e o processo de extensão a 68°C por 40 segundos, todo o processo de termo ciclagem ocorreu por 40 ciclos consecutivos, sendo que o ciclo final compreendeu em média o intervalo entre 75°C a 85°C (Yano et al., 2002).

FIGURA 2- StepOne™ Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific.



Foram obtidas curvas de MELT bem como a concentração de DNA de SM obtido em cada amostra (Figura 3). Para primeira análise dos dados que foram obtidos por meio dos testes de PCR, o limiar do ciclo do threshold (Ct) foi considerado como sendo o ciclo em que a fluorescência emitida pelo 1X SYBR GREEN foi detectada sobrepondo-se ao *background*.

FIGURA 3: Curva de Melting. Representação da especificidade da reação.



4.4.4 Análises estatísticas

As comparações das frequências de amostras com positividade para Pg foram comparadas entre si pelo teste do qui-quadrado. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

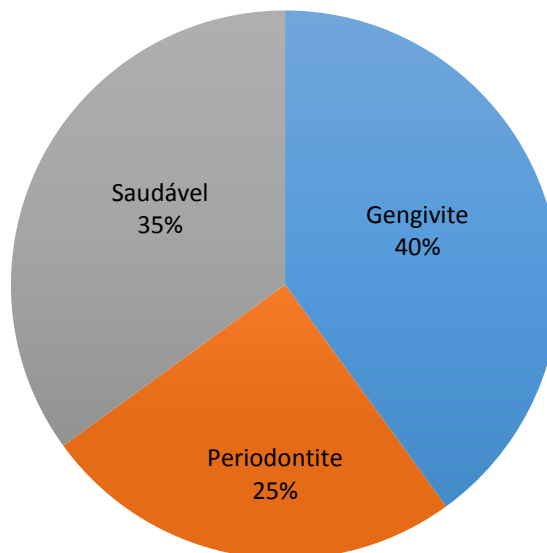
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As gestantes elegíveis eram saudáveis, sem história ou presença de doença sistêmica, com idade entre 18 e 38 anos (média de 24 anos), com gravidez sem intercorrências, não usuárias de drogas ilícitas, não utilizando corticoides ou antibióticos nos últimos meses, possuindo mais de 20 dentes.

Um total de 35% pacientes com periodonto saudável e 65% de mulheres que apresentaram uma das alterações periodontais durante a gravidez, sendo estas, 40% do total dessas gestantes apresentaram alguma alteração periodontal se tratava de gengivite e 25% periodontite (Gráfico 1).

GRÁFICO 1- Porcentagem de mulheres com gengivite, periodontite e sem doença periodontal no momento da coleta amostral

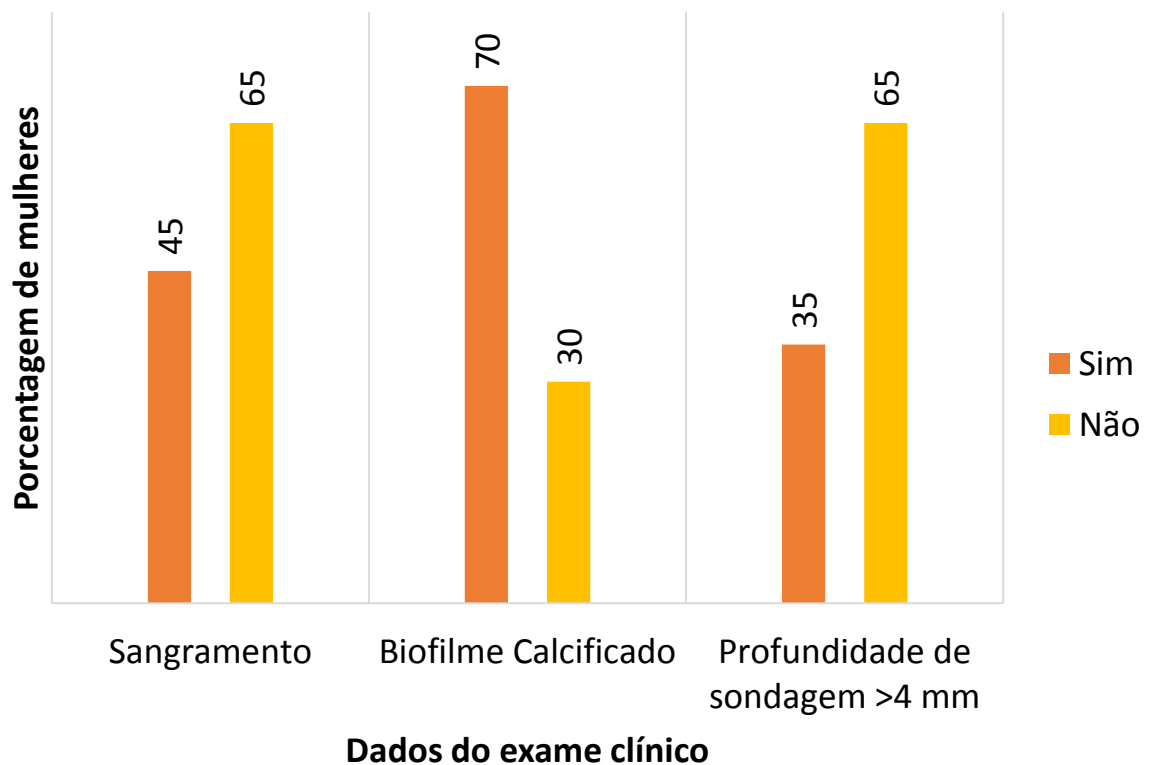
Condição Periodontal



Uma parcela das mulheres avaliadas clinicamente (45%) apresentaram sangramento gengival durante a sondagem (Gráfico 2), o que é uma manifestação muito comum durante o período gravídico. Com exceção de uma mulher que tinha periodontite, todas foram consideradas pacientes com gengivite. A gengivite, no período gestacional ocorre devido as alterações na permeabilidade vascular, no sistema imunológico e no biofilme subgengival (Raber-Durlacher *et al.*, 1994). A variação hormonal pode promover o crescimento excessivo de bactérias patogênicas responsáveis pela inflamação gengival (Mascarenhas *et al.*, 2003) o que pode explicar a presença do micro-organismo principalmente nas doentes periodontais e também naquelas que não tinham a gengivite instalada.

A condição de higiene das mulheres foi considerada regular em sua maioria, visto pela detecção de biofilme calcificado em 70% das voluntárias (Gráfico 2). A profundidade de sondagem, acima de 4 mm foi encontrado em 35% das gestantes e que foram incluídas no grupo das com periodontite detectável.

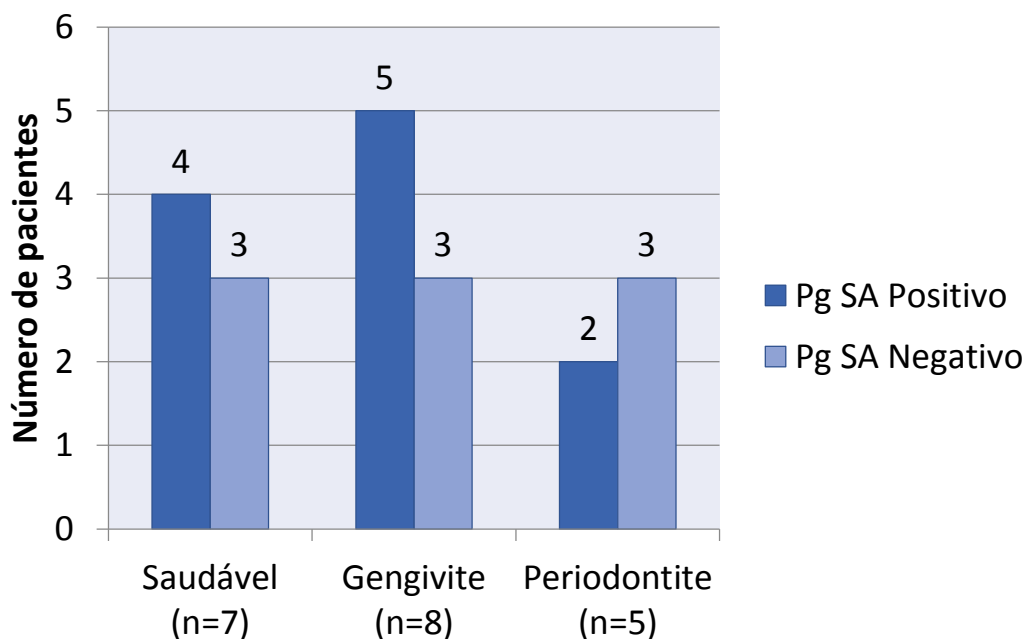
GRÁFICO 2- Porcentagem de mulheres que apresentaram ou não sangramento gengival, biofilme calcificado e profundidade de sondagem > que 4 mm.



Nas amostras salivares, 11 (55%) apresentaram a bactéria. A escolha desta espécie ocorreu por serem bactérias associadas frequentemente com a doença periodontal (Borgo *et al.*, 2014). Embora a detecção não diferencie micro-organismos vivos, mortos ou fragmentos bacterianos, os ensaios foram eficientes para detecção de DNA de Pg nas cepas padrão, bem como nas amostras testadas. A utilização de PCR é uma prática previamente testada e efetiva para detecção destas bactérias (Periasamy & Kolenbrander, 2009; Urban *et al.*, 2010). Além disto, os primers obtidos foram testados por Yoshida e colaboradores (2003) (Yoshida *et al.*, 2003) em amostras salivares e são altamente específicos para detecção das espécies (Yoshida *et al.*, 2003).

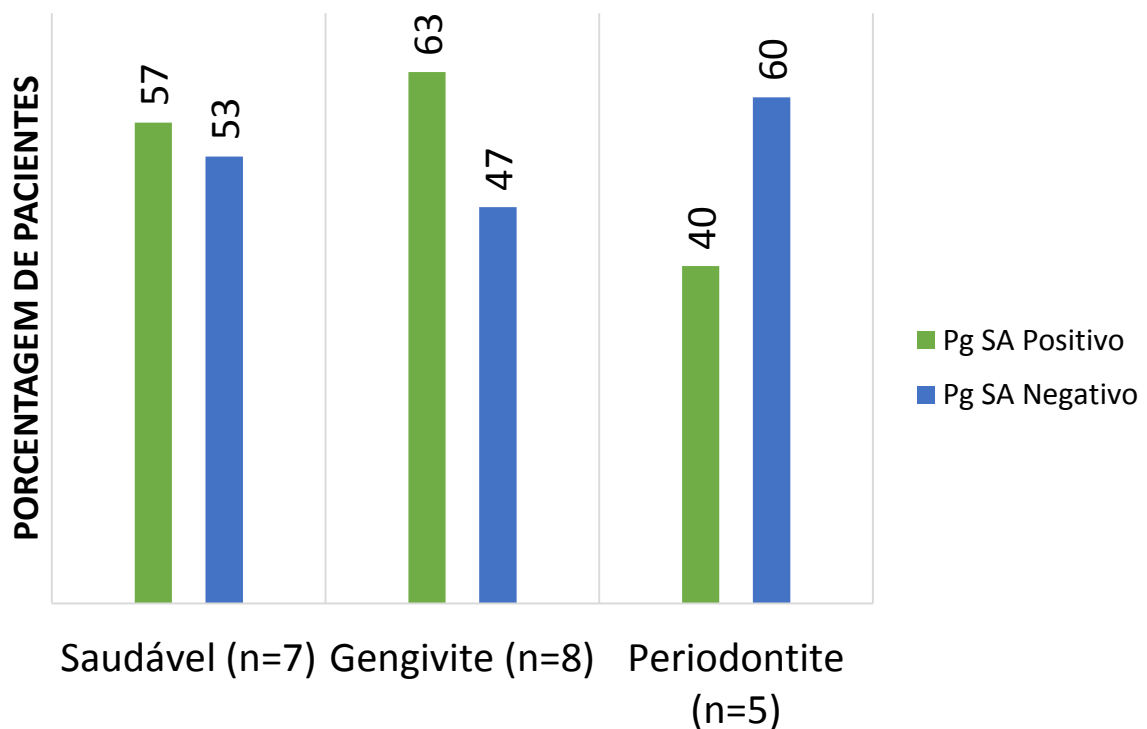
A análise comparativa entre os grupos de voluntárias com gengivite, periodontite e saudáveis quanto a presença de Pg na SA estão representados nos Gráficos 3 e 4 abaixo. Das amostras salivares que tiveram Pg detectável (n=11), 4 eram de pacientes saudáveis, 5 com gengivite e 2 com periodontite (Gráfico 3). A maioria das amostras de pacientes saudáveis e com gengivite apresentaram a bactéria (Gráfico 3) e não houve diferença estatisticamente significantes ($p < 0.05$). Os resultados mostraram que amostras salivares de pacientes com doença periodontal apresentaram Pg como encontrado em estudos prévios (Van Winkelhoff *et al.*, 1996; Casarin *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2017).

GRÁFICO 3- Frequência de amostras de saliva (SA) com presença ou não de *Porphyromonas gingivalis* entre as mulheres com gengivite, periodontite e saudável.



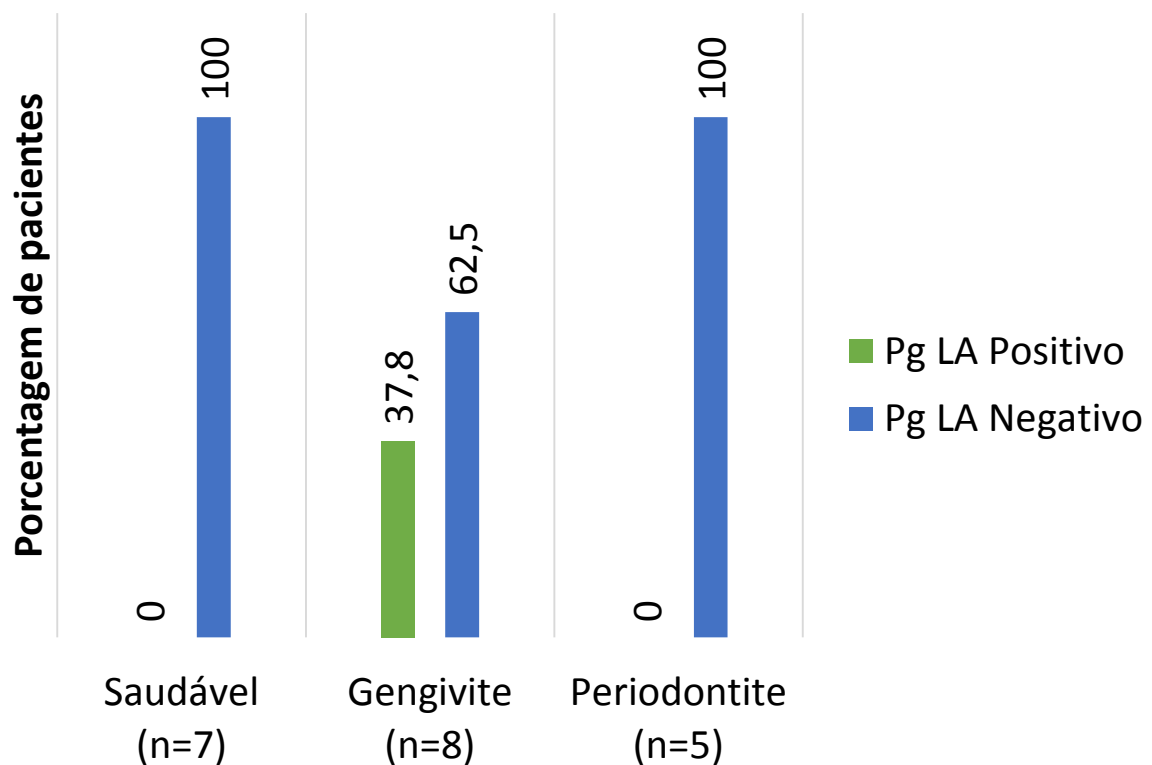
Embora *P. gingivalis* não seja considerado um habitante normal de uma dentição periodontalmente saudável (Griffen *et al.*, 1998) e raramente seja encontrado em gengivas saudáveis (Amano *et al.*, 2000), o presente estudo encontrou, em algumas gestantes (n=4, 57%, Gráfico 4) sem a gengivite instalada, níveis detectáveis de Pg nas amostras salivares. Uma relação simbiótica entre a microbiota oral residente, que pode incluir peridonto patógenos, e o hospedeiro é essencial para a homeostase oral, enquanto a alteração da microbiota subgengival é criticamente envolvida no desenvolvimento da periodontite (Kilian *et al.*, 2016). Nas amostras salivares de periodontite a maioria não teve Pg detectável não sendo estatisticamente diferente dos demais grupos. A periodontite é caracterizada pela presença de bactérias nas amostras subgengivais, como as amostras não foram obtidas em destes locais, provavelmente mais amostras teriam Pg detectável.

GRÁFICO 4- A presença da *Porphyromonas gingivalis* em amostras de saliva (SA) de gestantes com ou sem gengivite em porcentagem de pacientes.



A presença de Pg nas amostras avaliadas foi encontrada em apenas 3 amostras de LA, sendo apenas de pacientes com gengivite (37,8% destas, Gráfico 5). A presença de Pg no LA pode ocorrer pois nos casos de gengivite, o biofilme subgengival está em estreita proximidade com o tecido marginal gengival inflamado, onde o epitélio é ulcerado e o tecido conjuntivo subjacente é altamente vascularizado, o que resulta em um portal fácil de entrada para espécies bacterianas na circulação sanguínea (bacteremia) e possível disseminação para órgãos distantes (Herzberg & Weyer, 1998). Os relatos na literatura mostram que mulheres grávidas podem ter um aumento de sangramento gengival ocasionado pela gengivite devido a um aumento do tecido gengival com sangramento e intercâmbio da boca com o ambiente vascular o que possibilita o acesso das bactérias orais da mãe para o sangue e posteriormente para placenta (Niederman, 2013).

GRÁFICO 5- A presença da *Porphyromonas gingivalis* em amostras de LA (líquido amniótico) de gestantes com ou sem gengivite em porcentagem de pacientes.



A presença de Pg no LA, encontrada nas gestantes com gengivite, corrobora com os achados de estudos recentes, em que vários micro-organismos puderam ser isolados em amostras de sangue de cordão umbilical, líquido amniótico e nas membranas fetais, sem qualquer evidência clínica ou histológica de infecção ou inflamação nos pares de mães-filhos (Stout *et al.*, 2013; Aagaard *et al.*, 2014) e refutam a ideia de que o ambiente intrauterino seja livre de micro-organismos e que os fetos adquiram micro-organismos somente quando iniciavam o trânsito pelo canal vaginal e posteriormente pelo contato com a pele materna (Mackie *et al.*, 1999).

6 CONCLUSÕES

As conclusões do presente estudo foram que:

- Amostras salivares de pacientes com ou sem a doença periodontal não diferenciam a presença da bactéria;
- Amostras de LA em sua maioria não apresentam Pg mesmo em doentes gengivalmente;
- A gengivite parece ser uma situação que mais possibilita a detecção de Pg no LA.

REFERÊNCIAS

AAGAARD, K. et al. **The placenta harbors a unique microbiome.** *Sci Transl Med*, v. 6, n. 237, p. 237ra65, May 21 2014.

AAGAARD, K. M. Author response to comment on "**the placenta harbors a unique microbiome**". *Sci Transl Med*, v. 6, n. 254, p. 254lr3, Sep 17 2014.

AHN, J. et al. **Oral microbiome and oral and gastrointestinal cancer risk.** *Cancer Causes Control*, v. 23, n. 3, p. 399-404, Mar 2012.

ALI, R. W. et al. **Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients.** *J Clin Periodontol*, v. 23, n. 2, p. 133-9, Feb 1996.

AMANO, A. et al. **Prevalence of specific genotypes of Porphyromonas gingivalis fimA and periodontal health status.** *J Dent Res*, v. 79, n. 9, p. 1664-8, Sep 2000.

ASHIMOTO, A. et al. **Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions.** *Oral Microbiol Immunol*, v. 11, n. 4, p. 266-73, Aug 1996.

ASIKAINEN S, Chen C, Slots J. **Likelihood of transmitting Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in families with periodontitis.** *Oral Microbiol Immunol*. 1996 Dec;11(6):387-94. PubMed PMID: 9467371.

BASSANI, D. G. et al. **Periodontal disease and perinatal outcomes: a case-control study.** *J Clin Periodontol*, v. 34, n. 1, p. 31-9, Jan 2007.

BEARFIELD, C. et al. **Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth.** *BJOG*, v. 109, n. 5, p. 527-33, May 2002.

BIK, E. M. et al. **Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals.** *ISME J*, v. 4, n. 8, p. 962-74, Aug 2010.

BLANC, V. et al. **Oral bacteria in placental tissues: increased molecular detection in pregnant periodontitis patients.** *Oral Dis*, v. 21, n. 7, p. 905-12, Oct 2015.

BOGGESS, K. A. et al. Chronic maternal and fetal Porphyromonas gingivalis exposure during pregnancy in rabbits. Am J Obstet Gynecol, v. 192, n. 2, p. 554-7, Feb 2005.

BORGO, P. V. et al. Association between periodontal condition and subgingival microbiota in women during pregnancy: a longitudinal study. J Appl Oral Sci, v. 22, n. 6, p. 528-33, Nov-Dec 2014.

CASARIN, R. C. et al. Levels of Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. J Periodontal Res, v. 45, n. 5, p. 635-42, Oct 2010.

CURY, J. et. al Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. J Clin Periodontol. 2017 Mar;44 Suppl 18:S5-S11. doi: 10.1111/jcpe.12682

CRUZ, S. S. et al. [Maternal periodontal disease as a factor associated with low birth weight]. Rev Saude Publica, v. 39, n. 5, p. 782-7, Oct 2005.

DAVENPORT, E. S. et al. Maternal periodontal disease and preterm low birthweight: case-control study. J Dent Res, v. 81, n. 5, p. 313-8, May 2002.

DENG, K. et al. Subgingival Microbiome of Gingivitis in Chinese Undergraduates. Chin J Dent Res, v. 20, n. 3, p. 145-152, 2017.

DZINK, J. L. et al. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol, v. 15, n. 5, p. 316-23, May 1988.

ELATTAR, TM. et al. Prostaglandina E 2 na gengiva humana em saúde e doença e sua estimulação por esteróides sexuais femininos. Prostaglandins. 1976 Feb;11(2):331-41.

ERIKSEN EF, et al. Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. Science. 1988 Jul 1;241(4861):84-6.

FARDINI, Y. et al. Transmission of diverse oral bacteria to murine placenta: evidence for the oral microbiome as a potential source of intrauterine infection. Infect Immun, v. 78, n. 4, p. 1789-96, Apr 2010.

FARRELL, S. et al. **The relationship between maternal periodontitis, adverse pregnancy outcome and miscarriage in never smokers.** J Clin Periodontol, v. 33, n. 2, p. 115-20, Feb 2006.

FAVIER, C. F. et al. **Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates.** Appl Environ Microbiol, v. 68, n. 1, p. 219-26, Jan 2002.

GEORGE, A. et al. **Periodontal treatment during pregnancy and birth outcomes: a meta-analysis of randomised trials.** Int J Evid Based Healthc, v. 9, n. 2, p. 122-47, Jun 2011.

GOMES-FILHO, I. S. et al. **Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight.** J Clin Periodontol, v. 34, n. 11, p. 957-63, Nov 2007.

GOULBOURNE, P. A.; ELLEN, R. P. **Evidence that Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis fimbriae function in adhesion to Actinomyces viscosus.** J Bacteriol, v. 173, n. 17, p. 5266-74, Sep 1991.

GRIFFEN, A. L. et al. **Prevalence of Porphyromonas gingivalis and periodontal health status.** J Clin Microbiol, v. 36, n. 11, p. 3239-42, Nov 1998.

GUNCU, G. N. et al. **Effects of endogenous sex hormones on the periodontium--review of literature.** Aust Dent J, v. 50, n. 3, p. 138-45, Sep 2005.

HAFFAJEE, A. D. et al. **Microbial complexes in supragingival plaque.** Oral Microbiol Immunol, v. 23, n. 3, p. 196-205, Jun 2008.

HENRY, F. et al. **Blood vessel changes during pregnancy: a review.** Am J Clin Dermatol, v. 7, n. 1, p. 65-9, 2006.

HERZBERG, M. C.; WEYER, M. W. **Dental plaque, platelets, and cardiovascular diseases.** Ann Periodontol, v. 3, n. 1, p. 151-60, Jul 1998.

HOLT, S. C.; EBERSOLE, J. L. **Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis.** Periodontol 2000, v. 38, n., p. 72-122, 2005.

HOOPER, S. J. et al. **Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature.** *Head Neck*, v. 31, n. 9, p. 1228-39, Sep 2009.

JEFFCOAT, M. K. et al. **Periodontal infection and preterm birth: results of a prospective study.** *J Am Dent Assoc*, v. 132, n. 7, p. 875-80, Jul 2001.

JENKINSON, H. F. **Beyond the oral microbiome.** *Environ Microbiol*, v. 13, n. 12, p. 3077-87, Dec 2011.

JIMENEZ, E. et al. **Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section.** *Curr Microbiol*, v. 51, n. 4, p. 270-4, Oct 2005.

JIMENEZ, E. et al. **Is meconium from healthy newborns actually sterile?** *Res Microbiol*, v. 159, n. 3, p. 187-93, Apr 2008.

JOST, T. et al. **Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health.** *Nutr Rev*, v. 73, n. 7, p. 426-37, Jul 2015.

JOST, T. et al. **Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding.** *Environ Microbiol*, v. 16, n. 9, p. 2891-904, Sep 2014.

KATZ, J. et al. **Oral health and preterm delivery education: a new role for the pediatric dentist.** *Pediatr Dent*, v. 28, n. 6, p. 494-8, Nov-Dec 2006.

KHALILI, J. **Oral cancer: risk factors, prevention and diagnostic.** *Exp Oncol*, v. 30, n. 4, p. 259-64, Dec 2008.

KILIAN, M. et al. **The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals.** *Br Dent J*, v. 221, n. 10, p. 657-666, Nov 18 2016.

KINANE, D. F. et al. **Periodontal diseases.** *Nat Rev Dis Primers*, v. 3, n., p. 17038, Jun 22 2017.

KONG, H. H.; SEGRE, J. A. **Skin microbiome: looking back to move forward.** *J Invest Dermatol*, v. 132, n. 3 Pt 2, p. 933-9, Mar 2012.

KULKARNI, C.; KINANE, D. F. **Host response in aggressive periodontitis.** *Periodontol* 2000, v. 65, n. 1, p. 79-91, Jun 2014.

LAMONT, R. J.; JENKINSON, H. F. **Life below the gum line: pathogenic mechanisms of Porphyromonas gingivalis.** Microbiol Mol Biol Rev, v. 62, n. 4, p. 1244-63, Dec 1998.

LIN, D. et al. **Porphyromonas gingivalis infection during pregnancy increases maternal tumor necrosis factor alpha, suppresses maternal interleukin-10, and enhances fetal growth restriction and resorption in mice.** Infect Immun, v. 71, n. 9, p. 5156-62, Sep 2003.

LIU, Y. et al. **Prevalence of Porphyromonas gingivalis four rag locus genotypes in patients of orthodontic gingivitis and periodontitis.** PLoS One, v. 8, n. 4, p. e61028, 2013.

LOPEZ, N. J. et al. **Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight in women with pregnancy-associated gingivitis.** J Periodontol, v. 76, n. 11 Suppl, p. 2144-53, Nov 2005.

MACKIE, R. I. et al. **Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract.** Am J Clin Nutr, v. 69, n. 5, p. 1035S-1045S, May 1999.

MACONES, G. A. et al. **Treatment of localized periodontal disease in pregnancy does not reduce the occurrence of preterm birth: results from the Periodontal Infections and Prematurity Study (PIPS).** Am J Obstet Gynecol, v. 202, n. 2, p. 147 e1-8, Feb 2010.

MARIN, C. et al. **Correlation between infant birth weight and mother's periodontal status.** J Clin Periodontol, v. 32, n. 3, p. 299-304, Mar 2005.

MARIN, M. J. et al. **Comparison of the detection of periodontal pathogens in bacteraemia after tooth brushing by culture and molecular techniques.** Med Oral Patol Oral Cir Bucal, v. 21, n. 3, p. e276-84, May 01 2016.

MARTIN, R. et al. **Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut.** J Pediatr, v. 143, n. 6, p. 754-8, Dec 2003.

MARTIN-SOSA, S. et al. **Lactational changes in the fatty acid composition of human milk gangliosides.** Lipids, v. 39, n. 2, p. 111-6, Feb 2004.

MASCARENHAS, P. et al. **Influence of sex hormones on the periodontium.** J Clin Periodontol, v. 30, n. 8, p. 671-81, Aug 2003.

MENDES, M. M. Detecção de Streptococcus mutans em amostras de saliva, sangues do cordão umbilical e periférico de puérperas de boa saúde geral. 2016. 41 (Mestrado). Universidade de Uberaba, Brasil.

MEYER, D. H.; FIVES-TAYLOR, P. M. **Characteristics of adherence of Actinobacillus actinomycetemcomitans to epithelial cells.** Infect Immun, v. 62, n. 3, p. 928-35, Mar 1994.

MICHALOWICZ, B. S. et al. **Treatment of periodontal disease and the risk of preterm birth.** N Engl J Med, v. 355, n. 18, p. 1885-94, Nov 02 2006.

MOREU, G. et al. **Relationship between maternal periodontal disease and low-birth-weight pre-term infants.** J Clin Periodontol, v. 32, n. 6, p. 622-7, Jun 2005.

MACPHEE, Torquil. **Essential of periodontology and periodontics.** J Periodontol. 1970 May;41(5):287-9.

NIEDERMAN, R. **Pregnancy gingivitis and causal inference.** Evid Based Dent, v. 14, n. 4, p. 107-8, Dec 2013.

OFFENBACHER, S. et al. **Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery.** Obstet Gynecol, v. 107, n. 1, p. 29-36, Jan 2006.

OFFENBACHER, S. et al. **Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight.** J Periodontol, v. 67, n. 10 Suppl, p. 1103-13, Oct 1996.

PERIASAMY, S.; KOLENBRANDER, P. E. **Aggregatibacter actinomycetemcomitans builds mutualistic biofilm communities with Fusobacterium nucleatum and Veillonella species in saliva.** Infect Immun, v. 77, n. 9, p. 3542-51, Sep 2009.

PRINCE, A. L. et al. **The microbiome, parturition, and timing of birth: more questions than answers.** J Reprod Immunol, v. 104-105, n., p. 12-9, Oct 2014.

Parameter on systemic conditions affected by periodontal diseases. American Academy of Periodontology. J Periodontol. 2000 May;71(5 Suppl):880-3. PubMed PMID: 10875699.

PETERSEN PE, Ogawa H. **Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach.** J Periodontol. 2005 Dec;76(12):2187-93. Review. PubMed PMID: 16332229.

PETERSEN, PE, OGAWA, H et al **The global burden of oral diseases and risks to oral health.** Bull World Health Organ. 2005 Sep;83(9):661-9. Epub 2005 Sep 30.

RABER-DURLACHER, J. E. et al. **Experimental gingivitis during pregnancy and postpartum: clinical, endocrinological, and microbiological aspects.** J Clin Periodontol, v. 21, n. 8, p. 549-58, Sep 1994.

RADNAI, M. et al. **Possible association between mother's periodontal status and preterm delivery.** J Clin Periodontol, v. 33, n. 11, p. 791-6, Nov 2006.

RAJAPAKSE, P. S. et al. **Periodontal disease and prematurity among non-smoking Sri Lankan women.** J Dent Res, v. 84, n. 3, p. 274-7, Mar 2005.

RAMOS, E. S. M. et al. **Oral and vulvovaginal changes in pregnancy.** Clin Dermatol, v. 34, n. 3, p. 353-8, May-Jun 2016.

RAMSAY, D. T.; HARTMANN, P. E. **Milk removal from the breast.** Breastfeed Rev, v. 13, n. 1, p. 5-7, Mar 2005.

SAMBROOK, J.; GETHING, M. J. **Protein structure.** Chaperones, paperones. Nature, v. 342, n. 6247, p. 224-5, Nov 16 1989.

SHETTY, D. et al. **Oral hygiene status of individuals with cardiovascular diseases and associated risk factors.** Clin Pract, v. 2, n. 4, p. e86, Oct 12 2012.

SILVA, C. B. **ESTUDO COMPARATIVO DA PRESENÇA DE Streptococcus mutans EM AMOSTRAS DE SALIVA e COLOSTRO DE GESTAÇÕES SEM INTERCORRÊNCIAS.** 2016. 41 (Mestrado). Mestrado em Odontologia, Universidade de Uberaba, Brasil.

SLOTS, J.; TING, M. **Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: occurrence and treatment.** Periodontol 2000, v. 20, n., p. 82-121, Jun 1999.

STEEL, J. H. et al. **Maternal origin of inflammatory leukocytes in preterm fetal membranes, shown by fluorescence in situ hybridisation.** Placenta, v. 26, n. 8-9, p. 672-7, Sep-Oct 2005.

STOUT, M. J. et al. **Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations.** Am J Obstet Gynecol, v. 208, n. 3, p. 226 e1-7, Mar 2013.

SOCRANSKY SS, Haffajee AD. **The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts.** J Periodontol. 1992 Apr;63 Suppl 4S:322-331. doi: 10.1902/jop.1992.63.4s.322. PubMed PMID: 29539682.

TELES, R. et al. **Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology.** Periodontol 2000, v. 62, n. 1, p. 95-162, Jun 2013.

TORGERSON, R. R. et al. **Oral and vulvar changes in pregnancy.** Clin Dermatol, v. 24, n. 2, p. 122-32, Mar-Apr 2006.

URBAN, E. et al. **Detection of periodontopathogenic bacteria in pregnant women by traditional anaerobic culture method and by a commercial molecular genetic method.** Anaerobe, v. 16, n. 3, p. 283-8, Jun 2010.

VAN WINKELHOFF, A. J. et al. **Systemic antibiotic therapy in periodontics.** Periodontol 2000, v. 10, n., p. 45-78, Feb 1996.

VAN WINKELHOFF, A. J.; SLOTS, J. **Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in nonoral infections.** Periodontol 2000, v. 20, n., p. 122-35, Jun 1999.

VON, Troil-Lindén B, Torkko H, Alaluusua S, Wolf J, Jousimies-Somer H, Asikainen S. **Periodontal findings in spouses. A clinical, radiographic and microbiological study.** J Clin Periodontol. 1995 Feb;22(2):93-9.

VANTERPOOL, S. F. et al. **Porphyromonas gingivalis within Placental Villous Mesenchyme and Umbilical Cord Stroma Is Associated with Adverse Pregnancy Outcome.** PLoS One, v. 11, n. 1, p. e0146157, 2016.

WANG, J. et al. **Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease.** Sci Rep, v. 3, n., p. 1843, 2013.

WRIGHT, C. J. et al. **Microbial interactions in building of communities.** Mol Oral Microbiol, v. 28, n. 2, p. 83-101, Apr 2013.

WILLIAMS, R. C., & OFFENBACHER, S. **Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology.** Periodontology 2000, 23, 9-12.

XIONG, X. et al. **Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: a systematic review.** BJOG, v. 113, n. 2, p. 135-43, Feb 2006.

YANO, A. et al. **Real-time PCR for quantification of Streptococcus mutans.** FEMS Microbiol Lett, v. 217, n. 1, p. 23-30, Nov 19 2002.

YOSHIDA, A. et al. **Development of a 5' fluorogenic nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis.** J Clin Microbiol, v. 41, n. 2, p. 863-6, Feb 2003.

ZAMBON, J. J. et al. **Black-pigmented Bacteroides spp. in the human oral cavity.** Infect Immun, v. 32, n. 1, p. 198-203, Apr 1981.

ANEXOS



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br



Ribeirão Preto, 16 de março de 2011

Ofício nº 850/2011
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **"INFLUÊNCIA MATERNA NO DESENVOLVIMENTO E NA ATIVIDADE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE MUCOSA CONTRA PATÓGENOS ORAIS NO INÍCIO DA VIDA"** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 319ª Reunião Ordinária realizada em 14/03/2011 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 13290/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,


DRª MARCIA GUIMARAES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

RUCHELE DIAS NOGUEIRA

PROFª. DRª. VIRGÍNIA PAES LEME FERRIANI(Supervisora)

Depto. de Puericultura e Pediatria

Número: _____

Nome Mãe		nasc: ___/___/___ () anos
Endereço		Bairro: _____ Cidade: _____
Telefone	celular: _____	resid: _____
Convênio	() Não () SIM Qual?	

DADOS MATERNOS

1. Perfil racial:
 1. () branco 2. () afro-descendente 3. () amarelo 5. () índio
2. Escolaridade 1. () Nenhuma 2. () EF completo 3. () EF incompleto 4. () EM completo
 5. () EM incompleto 6. () ES completo 7. () Es incompleto.
3. Renda familiar aproximada R\$ _____/mês
4. Número de filhos _____. Idades _____
5. Qual o tempo de gestação? _____ semanas (Última menstruação)
6. Complicações durante gravidez? 1. () Sim 2. () Não Se sim, pq? _____
7. Realizou Pré-Natal? 1. () Sim 2. () Não Se sim, qual número de consultas? _____
8. Utilizou-se de medicação durante a gestação? 1. () Sim 2. () Não. Se sim, qual? _____ o motivo? _____
9. Fumante 1. () Sim 2. () Não
10. Diabetes 1. () Sim 2. () Não
11. Possui algum problema de saúde? 1. () Sim 2. () Não Qual? _____

Dados de Saúde - Oral

1. Frequenta regularmente o dentista? 1. () Sim 2. () Não Se sim, quando foi a última? _____
2. Apresenta dor em algum dente? 1. () Sim 2. () Não Qual? _____
3. Quantas vezes você escova os dentes por dia? 1. () 1 () 2 () 3 () 4 ou mais
4. Seus dentes sangram durante a higiene? 1. () Sim 2. () Não
5. Possui próteses dentais? 1. () Sim 2. () Não Tipo: _____

Exame Intra-Oral

I - LESÕES DA MUCOSA		DATA																																																	
CLASSIFICAÇÃO		II - ESTADO PERIODONTAL (ICNTP)																																																	
DESCRIÇÃO		0 = SACO PERIODONTAL 3 = BOLSA 4 - 5 mm 1 = SANGRAMENTO 4 = BOLSA - 6 mm 2 = TARTARO X = SEXTANTE EXCLUÍDO 17 / 16 11 25 / 27																																																	
LOCALIZAÇÃO		<table border="1"> <tr> <td>47 / 46</td> <td>31</td> <td>36 / 37</td> </tr> </table>		47 / 46	31	36 / 37																																													
47 / 46	31	36 / 37																																																	
DIAGNÓSTICO																																																			
ENCAMINHAMENTO																																																			
CID Nº																																																			
OBSERVAÇÃO																																																			
III - CÓDIGOS CÁRIE	IV - FLUOROSE	V - MÁ OCLUSÃO	VI - USO DE PRÓTESE																																																
0 = NENHUMA 1 = CÁRIE INCIPIENTE INATIVA 2 = RESTAURAÇÃO 3 = MANCHA BRANCA ATIVA 4 = CÁRIE ESMALTE CAVIDADE 5 = CÁRIE ENVOLVENDO DENTINA 6 = CÁRIE ENVOLVENDO POLPA	00 = AUSENTE 01 = PRESENTE VIII - HIGIENE ORAL 0A REGULAR BOA	00 = NENHUMA 01 = LEVE 02 = MODERADA 03 = GRAVE 04 = OUTROS	00 = NENHUMA 01 = PRÓTESE PARCIAL 02 = PRÓTESE TOTAL SUPERIOR INFERIOR SUPERIOR INFERIOR																																																
VII - NECESSIDADE DE																																																			
00 = NENHUMA 01 = NECESSIDADE DE REPARO 02 = PRÓTESE PARCIAL 03 = PRÓTESE TOTAL																																																			
IX - ODONTOGRAMA																																																			
<table border="1"> <tr> <td>18</td><td>17</td><td>16</td><td>15</td><td>14</td><td>13</td><td>12</td><td>11</td><td>21</td><td>22</td><td>23</td><td>24</td><td>25</td><td>26</td><td>27</td><td>28</td> </tr> <tr> <td colspan="16">[Grid for dental radiographs]</td> </tr> <tr> <td>48</td><td>47</td><td>46</td><td>45</td><td>44</td><td>43</td><td>42</td><td>41</td><td>31</td><td>32</td><td>33</td><td>34</td><td>35</td><td>36</td><td>37</td><td>38</td> </tr> </table>				18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	[Grid for dental radiographs]																48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28																																				
[Grid for dental radiographs]																																																			
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38																																				
X - CONSOLIDADO																																																			
DENT PER	TDE	C	O	GP	E	GPO	NS	CI	O	MA	GE	CD	CP	E	GPOS																																				
DENT DEG	td	c	o	gp	e	gpo	ns	ci	o	ma	ge	cd	cp	e	gpos																																				

DADOS DA CRIANÇA RECÉM NASCIDA Idade gestacional: _____ semanas

Data nasc.: ___/___/___ Sexo: () F () M Peso: _____ Kg Estatura: _____ cm

1. Perfil racial: 1. () branco 2. () afrodescendente 4. () amarelo 5. () índio

Exame Intraoral:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: **Influência Materna no desenvolvimento e na atividade da resposta imunológica de mucosa contra patógenos orais no início da vida**

Instituição onde será realizado: Mário Palmério Hospital Universitário e Universidade de Uberaba

Pesquisador Responsável: **Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins**

Identificação (conselho), telefone e e-mail: CRO/SP 80038, 34-33198958, ruchele_nogueira@yahoo.com.br

CEP-UNIUBE: Av. Nenê Sabino, 1801 – Bairro: Universitário – CEP: 38055-500- Uberaba/MG, tel: 34-3319-8959- e-mail: cep@uniube.br

Você (ou Seu/Sua)

_____ (colocar o nome e grau de parentesco do paciente/sujeito, no caso de menores) está sendo convidado para participar do projeto Investigação dos níveis de imunoglobulinas, citocinas e presença de *Streptococcus mutans* em amostras de líquido amniótico, de responsabilidade de Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins, cirurgiã dentista, CRO 80038, desenvolvido na Universidade de Uberaba e Mário Palmério Hospital Universitário.

Este projeto tem como objetivos analisar a presença de bactérias orais que causam a doença cárie e as defesas imunológicas, como anticorpos e proteínas, em dois tipos de amostras: do líquido amniótico e salivas. Este projeto se justifica pela necessidade de se compreender como a mãe pode proteger seu filho durante a gestação contra a cárie e ao mesmo tempo, transferir bactérias orais como *Streptococcus mutans* (que é a causadora da cárie) pelo líquido amniótico, que é um fluido deglutido pelo feto durante a vida intrauterina. Isto por que, recentes estudos vêm mostrando que as crianças brasileiras possuem estas bactérias muito cedo na boca, contribuindo para o desenvolvendo de cáries precocemente.

Este estudo pode trazer como benefícios, os conhecimentos gerados por esta pesquisa e o diagnóstico precoce de possíveis problemas bucais e de saúde geral, os quais serão transmitidos a vocês. Além da conscientização da importância da higiene oral nos primeiros meses de vida. Realizaremos encaminhamentos para avaliação especializada quando se fizer necessário. Se aceitar participar desse projeto, você permitirá que durante o nascimento do bebê será coletado uma colher de sopa de líquido amniótico com auxílio de uma pipeta. No dia seguinte ao parto, será coletado 1 colher de sopa da sua saliva para que possamos fazer os exames laboratoriais nestes materiais. Depois ocorrerá uma entrevista, realizada por pesquisadores participantes da pesquisa, sobre sua saúde e gravidez e também dados sobre o

bebê. Após esta entrevista, os pesquisadores lhes ensinarão como limpar a boca do seu bebê e como prevenir a cárie e examinar sua boca. Os resultados das coletas estarão a sua disposição após os exames. Os desconfortos serão mínimos para a senhora ou para seu filho (a), pois as coletas não causarão dor ou desconforto e não serão invasivas. O líquido amniótico e saliva serão colhidos por pessoas experientes e que tomarão todo o cuidado para que nenhum risco ocorra. Se ocorrerem, serão passageiras. Os seus dados serão mantidos em sigilo e serão utilizados apenas com fins científicos, tais como apresentações em congressos e publicação de artigos científicos. Seu nome ou qualquer identificação sua (voz, foto, etc) jamais aparecerá.

Os seus dados são confidenciais e serão passados para terceiros somente após a devida anonimização pela codificação dos dados, também os bancos de dados que contém suas informações terão senhas de acesso. Os pesquisadores e participantes da pesquisa poderão ter acesso às informações do questionário devendo-se assegurar o compromisso profissional com o sigilo absoluto das informações no TCLE”. Pela sua participação no estudo, você não receberá nenhum pagamento, e também não terá nenhum custo. Você pode parar de participar a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo para você ou para seu tratamento/atendimento. Sinta-se à vontade para solicitar, a qualquer momento, os esclarecimentos que você julgar necessários. Caso decida-se por não participar, ou por não ser submetido a algum procedimento que lhe for solicitado, nenhuma penalidade será imposta a você, nem seu tratamento ou atendimento será alterado ou prejudicado. Você receberá uma cópia desse termo, assinada pela equipe, onde consta a identificação e os telefones da equipe de pesquisadores, caso você queira entrar em contato com eles.

Uberaba _____/_____/_____

Nome _____ do _____ sujeito _____ da _____ pesquisa _____

Identificação (RG) do paciente/sujeito da pesquisa _____

Assinatura: _____

Ruchele Dias Nogueira G. Martins- Pesquisadora/Docente UNIUBE