

UNIVERSIDADE DE UBERABA  
MARCO ANTONIO MALUF CURI

**PRESENÇA DE *Porphyromonas gingivalis* E *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* NO SANGUE PERIFÉRICO, NA SALIVA E NO COLOSTRO MATERNO E NO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL DE GESTAÇÕES SEM INTERCORRÊNCIAS**

UBERABA – MG

2017



UNIVERSIDADE DE UBERABA  
MARCO ANTONIO MALUF CURI

**PRESENÇA DE *Porphyromonas gingivalis* E *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* NO SANGUE PERIFÉRICO, NA SALIVA E NO COLOSTRO MATERNO E NO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL DE GESTAÇÕES SEM INTERCORRÊNCIAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Odontologia da Universidade de Uberaba, área de concentração Biopatologia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

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

UBERABA – MG

2017

i

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Curi, Marco Antonio Maluf.

C925p Presença de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no sangue periférico, na saliva e no colostro maternos e no sangue do cordão umbilical de gestações sem intercorrências / Marco Antonio Maluf Curi – Uberaba, 2017.  
49 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Curso de Pós-graduação em Odontologia.

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

1. Boca – Doenças. 2. Doença periodontal. 3. Gengivite. 4. Odontologia. I. Curi, Marco Antonio Maluf. II. Universidade de Uberaba. Curso de Pós-graduação em Odontologia. III. Título.

CDD: 616.3107

MARCO ANTÔNIO MALUF CURI

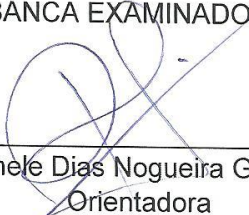
“PRESENÇA DE *Porphyromonas Gingivalis* E *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* NO SANGUE PERIFÉRICO, NA SALIVA E NO COLOSTRO MATERNO E NO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL DE GESTAÇÕES SEM INTERCORRÊNCIAS”

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Mestrado da Universidade de Uberaba.

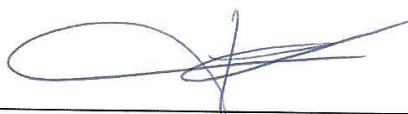
Área de concentração: Biopatologia

Aprovado (a) em: 14/12/2017

BANCA EXAMINADORA:



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins  
Orientadora  
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior  
Universidade de Uberaba



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Cristina Castanheira Guarato  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM



## **DEDICATÓRIA**

À Deus, em primeiro lugar sempre, sem Ele nada sou.

Aos meus pais, Valter e Maria Dora, cujos esforços possibilitaram minha formação pessoal e profissional.

O incentivo constante do educador, outrora camuflado pelo amor de mãe, é inspiração para a trajetória invariavelmente pautada pelo aprimoramento e capacitação.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos, fazendo a vida valer cada vez mais a pena.

À minha família, objetivo maior da minha existência.





## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À minha orientadora Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins, a quem devo agradecer pela amizade, carinho e a confiança na realização do trabalho. Seus ensinamentos, seus conselhos, sua capacidade intelectual e principalmente sua clareza nas orientações sempre foram fatores importantes durante o período de construção desse trabalho. Para sempre serei grato ao seu apoio e cultivarei intenso respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior, por toda atenção e colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

Muito Obrigado!



## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade de Uberaba, por meio do Magnífico Reitor Prof. Marcelo Palmério.

À Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Extensão, por meio do Pró-Reitor Prof. Dr. André Luís Teixeira Fernandes.

Aos Professores do Mestrado pelo apoio e ensinamento.

Aos colegas do curso de Mestrado pela convivência e experiências trocadas.

Às queridas amigas do laboratório Rayanne, Juliana e Camilla pela colaboração nos procedimentos laboratoriais, pela amizade e os bons momentos que passamos juntos.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Flávia Michele da Silva, pela prontidão em atender.

A todos os funcionários da Universidade Uberaba agradeço pelo trabalho executado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esta dissertação pudesse ser realizada.

A todos, o meu muito obrigado!



## RESUMO

A cavidade bucal representa uma porta de entrada de inúmeras espécies bacterianas que podem ocasionar doenças orais importantes, como a doença periodontal (DP), em especial as gengivites, que é muito comum em gestantes. Vários micro-organismos podem estar associados com a DP, como *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). O período gestacional representa um momento importante para a mãe e filho pois a exposição antigênica microbiana materna pode determinar a colonização e desenvolvimento imunológico fetal. Neste contexto, pouco se sabe sobre a presença e a transferência destes periodontopatógenos em gestações sem intercorrências. Os objetivos do presente estudo foram detectar Pg e Aa em amostras de sangue do cordão umbilical (SC) e comparar com sangue periférico (SP), saliva (SA) e de colostro (C) de gestantes com ou sem gengivite, em gestações a termo e sem intercorrências, e relacionar com dados coletados em questionários de saúde aplicados na admissão materna. Para tanto, 43 conjuntos destas amostras foram analisadas. Os exames clínicos orais foram realizados em todas as gestantes para diagnóstico de gengivite. A presença de material genético de Pg e Aa nas amostras foi realizada através de ensaios de PCR quantitativo com primers específicos. Os resultados revelaram que todas as SA de pacientes com gengivite (n=15) apresentaram as duas bactérias, diferindo estatisticamente das que não foram diagnosticadas com a doença, já que uma minoria apresentou as bactérias (p<0.05). Nenhuma gestante sem a doença apresentou as bactérias nas amostras sanguíneas ou no C. Das gestantes com gengivite, 60% apresentaram Pg nas amostras sanguíneas (p<0.05) e 46,6% a apresentaram no C. Nenhuma gestante com gengivite apresentou Aa no SP e SC, mas 46,6% apresentaram no C. Não houve associação entre dados socioeconômicos e de saúde oral, detecção dos micro-organismos e presença da doença. Em conclusão, a gengivite esteve relacionada com a detecção positiva dos micro-organismos na saliva. Somente gestantes com gengivite apresentaram Pg no SP e SC. A presença Pg e Aa no colostro ocorreu apenas em gestantes com gengivite.

**Palavras-chave:** *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, sangue do cordão umbilical, sangue periférico, saliva, colostro.



## ABSTRACT

The oral cavity represents a gateway to several bacterial species that can cause important oral diseases, such as periodontal disease (PD), especially gingivitis, which is very common in pregnant women. Several microorganisms may be associated with PD, such as *Porphyromonas gingivalis* (Pg) and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). The gestational period represents an important moment for the mother and child since the maternal microbial antigenic exposure can determine the colonization and fetal immunological development. In this context, little is known about the presence and transference of these periodontopathogens in uncomplicated pregnancies. The objective of the present study was to detect Pg and Aa in umbilical cord blood samples (CB) and to compare with peripheral blood (PB), saliva (SA) and colostrum (C) of pregnant women with or without gingivitis in term pregnancies and without intercurrents, and to relate with data collected in health questionnaires applied in maternal admission. For this, 43 sets of these samples were analyzed. Oral clinical exams were performed in all pregnant women to diagnose gingivitis. The presence of Pg and Aa genetic material in the samples was performed by quantitative polymerase chain reaction assays with specific primers. The results showed that all SA of patients with gingivitis (n = 15) presented the two bacteria, differing statistically from those that were not diagnosed with the disease, since a minority presented the bacteria (p <0.05). No pregnant woman without the disease showed the bacteria in the blood samples or in C. Of the pregnant women with gingivitis, 60% presented Pg in the blood samples and 46.6% presented in C. No pregnant women with Gingivitis presented Aa in PB and CB, but 46.6% presented in C. There was no association between socioeconomic and health data detection of the microorganisms in the samples. In conclusion, gingivitis was related to the positive detection of the microorganisms analyzed in saliva. Only pregnant women with gingivitis presented Pg in PB and CB. The presence of Pg and Aa in colostrum occurred only in pregnant women with gingivitis.

**Keywords:** *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, umbilical cord blood, peripheral blood, saliva, colostrum.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do processo de extração do DNA cromossomal kit PowerLyzer® PowerSoil DNA Isolation.....	21
<b>Figura 2.</b> Curva de Amplificação do PCR-RT. Representação da especificidade da reação.....	23
<b>Figura 3.</b> Software StepOne®.....	24
<b>Figura 4.</b> Diagrama esquemático que evidencia a presença de Pg na saliva (SA), sangue periférico (SP), sangue do cordão (SC) e colostro (C) nas gestantes portadoras ou não de gengivite (n = 43).....	30
<b>Figura 5.</b> Diagrama esquemático que evidencia a presença de Aa na saliva (SA), sangue periférico (SP), sangue do cordão (SC) e colostro (C) nas gestantes portadoras ou não de gengivite (n = 43).....	33



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Apresentação do gene e a sequência dos pares de bases dos oligonucleotídeos.....	22
<b>Tabela 2.</b> Frequência de gestantes portadoras ou não de gengivite gravídica de acordo com tipo de parto e raça (n = 43).....	27
<b>Tabela 3.</b> Frequência de gestantes portadoras ou não de gengivite relacionado com quantidade de escovação diária, tratamento odontológico durante a gestação, presença de sangramento gengival e assiduidade nas visitas ao dentista (n = 43).....	28
<b>Tabela 4.</b> Frequência de detecção de Pg em amostras de saliva (SA), de sangue periférico (SP), de sangue do cordão (SC) e de colostro (C) relacionado à presença ou não de gengivite gravídica (n = 43).....	29
<b>Tabela 5.</b> Frequência de detecção de Aa em amostras de saliva (SA), de sangue periférico (SP), de sangue do cordão (SC) e de colostro (C) relacionado à presença ou não de gengivite gravídica (n = 43).....	32



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**C:** Colostro.

**CT:** Limiar de ciclo.

**ADN:** ácido Desoxirribonucleico.

**ARN:** ácido Ribonucleico.

**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético.

**MATER HC-FMRP:** Centro de Referência em Saúde da Mulher do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

**SA:** Saliva materna.

**SC:** Sangue do cordão umbilical.

**TCLE:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**UNIUBE:** Universidade de Uberaba.

**USP:** Universidade de São Paulo.

**qPCR:** PCR quantitativo.

**°C:** Grau Celsius.

**cm:** Centímetros.

**mL:** Mililitro

**µL:** Microlitro

**g:** Força centrífuga.

**mM:** Milimolar.

**nm:** Nanômetro.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	17
2.1. Geral.....	17
2.2. Específicos.....	17
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
3.1. Delineamento do estudo e coleta amostral.....	18
3.2. Detecção de Pg e Aa nas amostras.....	19
3.2.1. Extração de ADN das amostras.....	19
3.2.2. Quantificação do ADN extraído.....	21
3.2.3. PCR quantitativo (qPCR) das amostras.....	22
3.3. Análises estatísticas.....	24
<b>4. RESULTADOS</b> .....	26
4.1. Dados gerais das amostras analisadas.....	26
4.2. Dados socioeconômicos e clínicos entre pacientes com e sem gengivite.....	26
4.3. Detecção de Pg nas amostras e dados obtidos no questionário e no exame clínico.....	28
4.4. Detecção de Aa nas amostras e dados obtidos no questionário e no exame clínico.....	30
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	40
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41
<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b> .....	48
<b>ANEXO B – QUESTIONÁRIO</b> .....	49





## 1. INTRODUÇÃO

O corpo humano apresenta uma grande quantidade de sítios mucosos, cada um composto de um meio específico de micro-organismos altamente adaptados, comensais e que podem se tornar oportunistas. A cavidade oral possui mais de 700 tipos diferentes de bactérias, que de forma dinâmica, constituem a microbiota oral composta por micro-organismos transitórios e residentes. Uma das mais complexas e altamente variáveis comunidades do organismo é o microbioma oral, que representa uma rede bioquímica multidimensional única e vastamente dinâmica, formada pela interação entre os micro-organismos, os hábitos comportamentais, higiênicos e dietéticos e os fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro (Khalili, 2008; Jenkinson, 2011; Teles *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2013). Algumas dessas interações produzem compostos potencialmente patogênicos que podem ter efeito sobre o revestimento de mucosa, os tecidos circundantes e até mesmo órgãos distantes e sistemas do corpo (Hooper *et al.*, 2009; Jenkinson, 2011; Ahn *et al.*, 2012) como no caso da doença periodontal.

A doença periodontal é uma das doenças mais comuns na cavidade oral sendo definida como uma inflamação gengival e dos tecidos de suporte do dente, ocasionada pelo acúmulo de biofilme bacteriano ao longo da margem gengival e agravada por uma higiene oral negligente, combinada com a resposta imune do hospedeiro, presença ou não de alterações sistêmicas e aspectos comportamentais e a virulência dos micro-organismos envolvidos (Shetty *et al.*, 2012). 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 iniciado por bactérias do biofilme microbiano que se forma nos dentes e na gengiva. A periodontite torna-se crônica quando a gengivite não tratada progride para a perda

da gengiva, de osso e ligamento, criando fundas bolsas periodontais que são uma característica da doença e pode eventualmente levar à perda de dente. A periodontite crônica pode ser subclassificada como peri-implantite, periodontite agressiva (formas localizadas ou generalizadas, ambas manifestando-se entre a puberdade e a terceira década da vida), ulcerativa-necrotizante e as sindrômicas (Kulkarni & Kinane, 2014; Kinane *et al.*, 2017).

Bactérias gram-negativas como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas noxia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* são frequentemente isoladas a partir de biofilmes dentários de pacientes com doenças periodontais e são consideradas patógenos específicos da doença (Zambon *et al.*, 1981; Wang *et al.*, 2013). Das bactérias que residem no biofilme subgingival, a *A. actinomycetemcomitans* juntamente com *P. gingivalis* e *T. forsythia* têm sido os patógenos específicos mais frequentemente associados com doença inflamatória crônica (Dzink *et al.*, 1988; Ali *et al.*, 1996; Ashimoto *et al.*, 1996; Haffajee *et al.*, 2008)

*P. gingivalis* é uma bactéria que pertence à família *Bacteroidaceae*, é um coco-bacilo gram-negativo anaeróbico estrito que possui diversos fatores de virulência como por exemplo fimbrias, proteases, peptidases, hemaglutininas e lipopolissacarídeos (Goulbourne & Ellen, 1991), que dão o caráter “destrutivo” deste micro-organismo e o faz ser um importante agente causador da doença periodontal. Seu habitat natural é na cavidade oral, principalmente em bolsas periodontais profundas e se adere facilmente às outras bactérias, substratos fornecidos por células e componentes da matriz extracelular (Holt & Ebersole, 2005). O principal resultado de sua ação consiste em: lesão tecidual e desregulação dos sistemas imune e inflamatório do hospedeiro (Lamont & Jenkinson, 1998).

*A. actinomycetemcomitans* é um coco-bacilo fermentativo Gram-negativo, implicado não apenas na patogênese de doença periodontal (Slots & Ting, 1999), mas também em uma

variedade de doenças sistêmicas como endocardite, meningite e osteomielite (Van Winkelhoff Slots, 1999). Sua ultraestrutura de superfície inclui fimbrias, vesículas e material amorfo extracelular (Meyer & Fives-Taylor, 1994).

Na gestação o organismo da mulher sofre muitas alterações hormonais, o que pode ocasionar quadros de hiperplasia gengival, gengivite gravídica e granuloma piogênico (Guncu *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2016). Dentre essas doenças, a gengivite é considerada a mais comum durante a gravidez e pode 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. As mudanças inflamatórias geralmente começam durante o 2º mês e a gravidade aumenta até o 8º mês, podendo estar relacionado com o aumento dos hormônios femininos, que promovem uma reação inflamatória gengival, devido a ação que estes possuem de vasodilatação (Henry *et al.*, 2006; Torgerson *et al.*, 2006). Essa vasodilatação pode levar à disseminação dos micro-organismos relacionados à doença periodontal da mãe para o feto, ocasionando ou não complicações para o mesmo (Torgerson *et al.*, 2006).

A associação entre condição periodontal materna e gestação enfatiza o envolvimento dos micro-organismos associados especialmente à periodontite com nascimentos de prematuros e de baixo peso ao nascer (NPBP) (Lopez *et al.*, 2005). Embora alguns estudos encontraram associação entre doença periodontal e NPBP (Jeffcoat *et al.*, 2001; Marin *et al.*, 2005) outros em contrapartida não encontraram essa associação evidente entre doença periodontal e NPBP (Moreu *et al.*, 2005; Farrell *et al.*, 2006).

A explicação para a associação entre a doença periodontal e NPBP está no rompimento precoce da membrana amniótica devido a liberação de mediadores inflamatórios circulantes acionados pelos micro-organismos presentes no biofilme subgengival (Davenport *et al.*, 2002;

Marin *et al.*, 2005; Rajapakse *et al.*, 2005; Katz *et al.*, 2006; Michalowicz *et al.*, 2006; Offenbacher *et al.*, 2006; Radnai *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2006; Bassani *et al.*, 2007). Também pode ser que haja translocação de bactérias ou produtos bacterianos do biofilme subgengival para a circulação sistêmica. Esta bacteremia transitória ocorre em indivíduos com periodontite marginal ou com gengivite, e é possível que as bactérias e seus produtos possam atingir as membranas placentárias de forma hematogênica e proporcionar o efeito inflamatório para induzir o parto prematuro (Lopez *et al.*, 2005).

Apesar das fortes evidências do envolvimento da doença periodontal nos partos prematuros, ainda há necessidade destes achados serem validados através de ensaios de controle randomizados maiores e mais direcionados (George *et al.*, 2011), principalmente em razão dos achados que evidenciam que o tratamento da doença periodontal, em mulheres grávidas, melhora a condição oral, e é seguro, mas não altera significativamente as taxas de parto prematuro, baixo peso ao nascer ou a restrição de crescimento fetal (Michalowicz *et al.*, 2006; Macones *et al.*, 2010).

Em humanos, 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).

Evidências clínicas e laboratoriais mostram que há micro-organismos na placenta, sangue do cordão umbilical, líquido amniótico e mecônio em gestações a termo, sem infecções evidentes (Bearfield *et al.*, 2002; Jimenez *et al.*, 2005; Steel *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2008; 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 albergados na cavidade bucal, e qual o

seu papel na estimulação do neonato. Várias espécies bacterianas, tais como *Enterococcus faecium*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus sanguinis* foram encontradas no sangue do cordão umbilical (Jimenez *et al.*, 2005), sendo que tais espécies fazem parte da microbiota das crianças desde os primeiros dias de vida (Favier *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2003) e em crianças predispostas, podem estar envolvidas no desenvolvimento de infecções oportunistas (Jimenez *et al.*, 2005).

Estudos em modelos animais, de infecção com micro-organismos orais comensais, mostraram alguns colonizando o feto e placenta sem que ocorra um processo inflamatório instalado (Lin *et al.*, 2003; Boggess *et al.*, 2005; Fardini *et al.*, 2010). Sequenciamento de amostras de placentas mostrou que o microbioma placentário não se assemelha aos microbiomas vaginais ou intestinais, como se pensava anteriormente, sendo este mais semelhante à microbiota oral normal, especialmente da língua e amígdala (Aagaard, 2014).

Estudos recentes, com as mesmas amostras do presente estudo, mostraram que *Streptococcus mutans*, patógeno comensal da cavidade bucal, pode ser detectado em amostras de colostro (Silva, 2016), de sangue periférico e do cordão (Mendes, 2016), independente da detecção na saliva e na ausência de processo cariioso materno. Estes resultados foram sugestivos de que a transferência de micro-organismos orais, durante a vida intrauterina, pode estar associada não só com a colonização precoce oral, mas também com o desenvolvimento do sistema imune de mucosa e da tolerância à colonização oral comensal do neonato.

Diante do exposto, há necessidade de se entender se ocorre a presença de dois micro-organismos envolvidos na doença periodontal, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, em gestantes diagnosticadas com gengivite ou não, e que apresentaram gestações sem intercorrências e partos a termo.

## 2. OBJETIVOS

Avaliar a presença de duas bactérias da doença periodontal: *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), em amostras biológicas de puérperas com boa saúde geral, diagnosticadas ou não com gengivite.

Os objetivos específicos incluem:

- Verificar a presença de Pg e Aa em amostras de: saliva (SA), sangue periférico (SP) e colostro (C) maternos, bem como de sangue do cordão umbilical (SC);
- Comparar a detecção dos micro-organismos entre as amostras e entre as gestantes com gengivite e sem a doença.
- Associar a detecção dos micro-organismos nas amostras, dados coletados de saúde geral e hábitos orais e diagnóstico da doença periodontal.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Delineamento do estudo e coleta amostral

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (protocolo número 13290/2010, DOCUMENTO ANEXO) e foi realizado de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki. O consentimento informado por escrito foi obtido de todas as pacientes. As amostras analisadas foram derivadas de uma coorte de 416 gestantes que realizaram o parto no Centro de Referência em Saúde da Mulher do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (MATER). Estas gestantes foram selecionadas segundo os seguintes critérios de inclusão: mulheres grávidas, 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 e possuindo mais de 20 dentes. Estas gestantes elegíveis foram entrevistadas e assinaram o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). A entrevista compreendeu perguntas sobre dados socioeconômicos, hábitos de higiene oral, visitas ao dentista, entre outras (APÊNDICE).

Em seguida, foram submetidas a um exame clínico intra-oral para avaliação e detecção de doenças orais como cárie e doença periodontal. O exame foi realizado por cirurgiões dentistas treinados para 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, mesio-vestibular, disto-lingual, médio-lingual, mesio-lingual) para cada dente. Um total de quinze gestantes que tiveram resultado positivo para a gengivite foram utilizadas para o presente estudo. 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).

Aleatoriamente foram selecionadas mais 28 amostras de pacientes de boa saúde oral e que não apresentaram todos os critérios de diagnóstico de gengivite.

As coletas do sangue periférico (SP) e da saliva (SA) não estimulada foram realizadas na admissão da paciente após a assinatura do TCLE. As salivas foram coletadas pela sucção com pipetas graduadas estéreis e depositadas em eppendorfs e armazenadas em gelo.

As amostras de sangue do cordão umbilical (SC) foram realizadas imediatamente após a secção do cordão e dequitação, quando então a placenta foi colocada sobre um suporte vazado com cerca de 30 cm de altura. Após a realização da antisepsia do cordão umbilical, a veia umbilical foi puncionada com "scalp" flexível e o sangue coletado em seringas de 50 ml contendo anticoagulante. As coletas de colostro (C) foram realizadas após o parto, pela ordenha manual após assepsia das mamas por enfermeiras da MATER, anteriormente à primeira mamada.

As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 1300 rpm, transferidas para tubos estéreis e armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização dos ensaios. Todas as amostras foram transportadas em gelo para a Laboratório de Biopatologia da Universidade de Uberaba (UNIUBE) para extração do material genético e posteriormente para o Laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro de Uberaba (UFTM).

## **3.2. Detecção de Pg e Aa nas amostras**

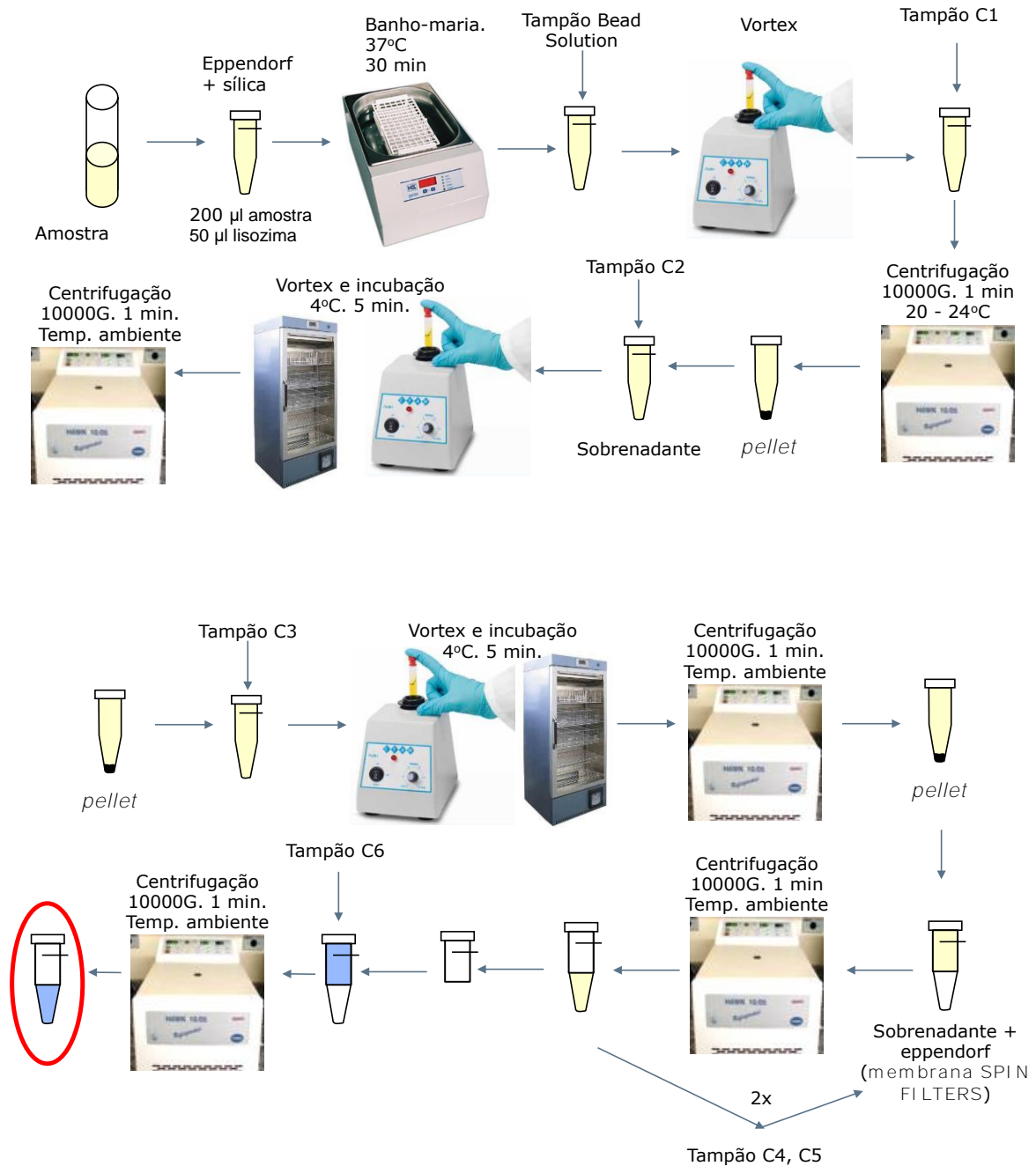
### **3.2.1. Extração de ADN das amostras**

As amostras foram submetidas à extração do ADN de acordo com o protocolo do fabricante do kit *PowerLyzer® PowerSoil DNA Isolation* (PROMEGA, Carlsbad. CA) 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 (auxilia na lise celular) e foram agitadas em vórtex



para homogeneização centrifugadas a 10.000 xg, por 30 segundos em temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo em que foi aplicado 250 µL de solução C2 (remove contaminantes orgânicos e inorgânicos) que foi agitado e incubado a 4°C por 5 minutos. Após a centrifugação em temperatura ambiente por 1 minuto a 10.000 xg foi retirado o sobrenadante e adicionado 200 µL de solução C3 (precipita o material orgânico e inorgânico removendo contaminantes). Em seguida, o eppendorf foi levado ao vórtex brevemente e incubado por 5 minutos a 4°C. As amostras foram novamente centrifugadas em temperatura ambiente por 1 minuto a 10.000 xg.

Ao sobrenadante obtido foram adicionados 1200 µL da solução C4 (auxilia na ligação do ADN) e o eppendorf foi levado por 5 segundos ao vórtex. Foram transferidos para um novo eppendorf (Spin Filter) 675 µL do sobrenadante que se formou e o conteúdo foi centrifugado a 10.000 xg por 1 minuto até que o sobrenadante fosse filtrado através do filtro. O volume filtrado foi desprezado e foram adicionados 500 µL da solução C5 (remove as impurezas facilitando o ADN a se ligar a sílica) e centrifugado a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 xg. Para finalização do processo, o eppendorf foi centrifugado sem nenhum líquido adicional, apenas contendo o material genético aderido à membrana, afim de que o ADN bacteriano pudesse atravessar o filtro. Após este passo, o conteúdo genético foi transferido para um novo eppendorf e em seguida adicionado 100 µL da solução C6 (ADN se liga ao elevado teor de sal e é liberado seletivamente) e levado a centrifuga em temperatura ambiente a 10.000 xg por 30 segundos. Após a centrifugação o filtro foi descartado, o material genético que atravessou a membrana foi preservado a temperatura ambiente, restando ao final do processo 100 µL de ADN pronto para uso.



**Figura 1.** Representação esquemática do processo de extração do ADN cromossomal kit *PowerLyzer® PowerSoil DNA Isolation*.

### 3.2.2. Quantificação do ADN extraído

Após extração do ADN das amostras foi realizada a quantificação de material genético extraído bem como seu grau de pureza. Para isto 2 µL da amostra foi analisado 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 apresentavam valores entre 1.8 e 2.0. Para valores fora deste intervalo as extrações foram descartadas e repetidas, já que valores maiores que estes intervalos indicam contaminação por ARN e abaixo sugerem a presença de proteínas (Sambrook & Gething, 1989).

### 3.2.3. PCR quantitativo (qPCR) das amostras

Os ensaios de qPCR das amostras foram realizados em duplicatas e comparados a dois iniciadores que asseguraram a reatividade e/ou negatividade, através da realização dos ensaios com ADN extraído de cepas de *Pg* e *Aa*, como controle positivo e água ultrapura livre de qualquer tipo de ADN, como controle negativo. Para os experimentos foram utilizados os primers de oligonucleotídeos para as cepas microbianas (Extend Biotecnologia Ltda.), como descritos por (Yano *et al.*, 2002) e demonstrado na Tabela 1.

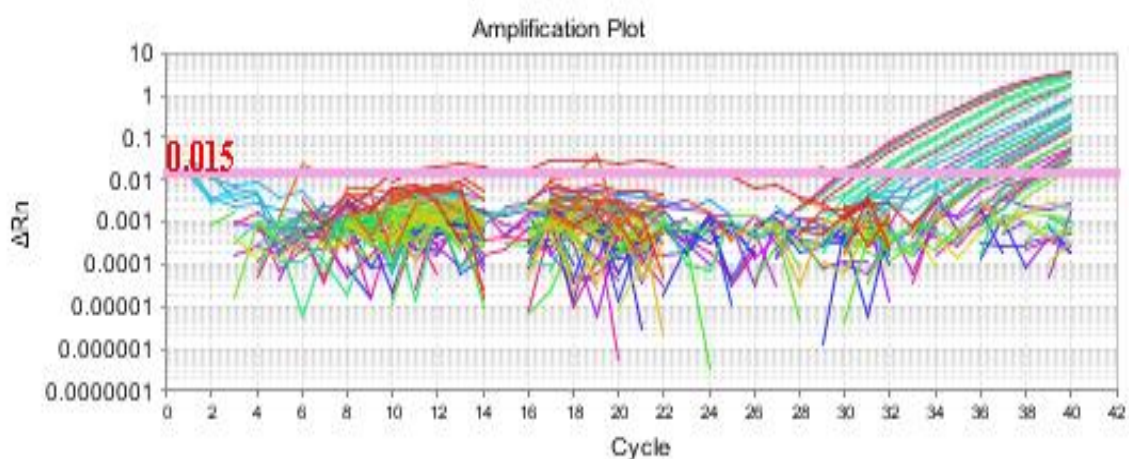
**Tabela 1.** Sequência dos pares de bases dos oligonucleotídeos utilizados para identificação dos micro-organismos pesquisados.

<i>Micro-organismos</i>	<i>Sequência</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Forward, TAC CCA TCG TCG CCT TGG T  Reverse, CGG ACT AAA ACC GCA TAC ACT TG
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Forward, CAG CAT CTG CGA TCC CTG TA  Reverse, TCA GCC CTT TGT CTT TCC TAG GT

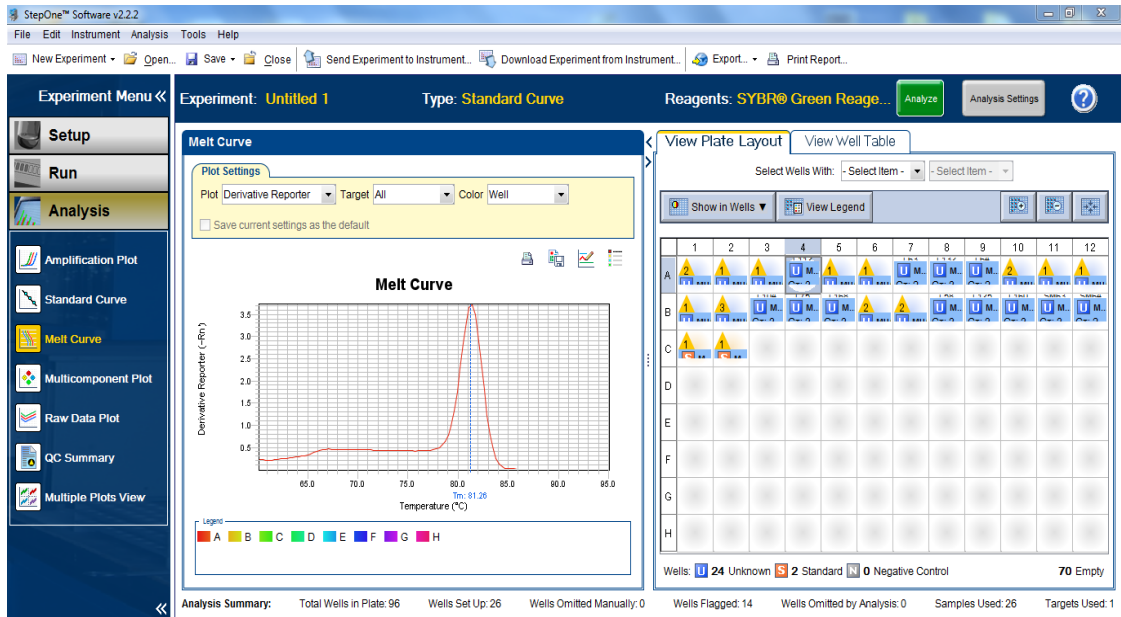
Os oligonucleotídeos foram previamente dissolvidos em TE 1X [10 mM tris-HCL. EDTA 1mM (pH 7.5-8.0)]. Foi utilizado um mix, que continha: 4,5  $\mu$ L de 1X Sybr green master mix (Roche), 1  $\mu$ L de cada primer, 4,5 $\mu$ L de água ultrapura livre de ADN e 2  $\mu$ L de amostra de ADN cromossomal. Em seguida, este mix foi depositado em uma placa MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (Costar) que foi selada adequadamente, levada para um "speed" de 2 segundos e colocada no termociclador.

O termociclador utilizado na realização da técnica foi programado para obter uma desnaturação do ADN 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 se deu em 40 ciclos consecutivos sendo que o ciclo final compreendeu em média o intervalo entre 75°C a 85°C (Yano *et al.*, 2002).

Foram obtidas curvas de MELT de ADN de Pg e Aa obtidos em cada amostra (FIGURA 2). Para primeira análise dos dados obtidos por meio dos testes de PCR, considerou-se o limiar do Ciclo Threshold (CT), como sendo o ciclo em que a fluorescência emitida pelo 1X SYBR GREEN foi detectada sobrepondo-se ao *background*.



**Figura 2.** Curva de Amplificação do qPCR. Representação da especificidade da reação.



**Figura 3.** Software StepOne®.

Os sinais de fluorescências, emitidos pelo 1X Syber Green a medida que o produto é amplificado, são expressos graficamente (sinais de fluorescência versus número de ciclos), como pode ser observado (FIGURA 3), permitindo monitorar em tempo real através do Software StepOne®, a cinética e a eficiência da reação de amplificação, ou seja, esta metodologia permite monitorar o momento em que a fluorescência emitida pelo produto amplificado ultrapassa o limiar de detecção (indicado por  $CT=0.015$  na FIGURA 2). O CT indica o momento a partir do qual a reação é otimizada (fase exponencial) e o produto amplificado pode ser quantificado pela intensidade de fluorescência emitida.

### 3.3. Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o Software BioStat®. As frequências de amostras com positividade para ADNA de Aa e Pg foram comparadas entre si e com os dados obtidos pelo questionário pelo do teste do Qui-quadrado ou pelo Teste Exato de Fisher (quando

as repetições foram menores que 5). As diferenças entre as variáveis numéricas (renda mensal, semanas de gestação, número de escovações, idades, intensidade de fluorescência emitida em CT) foram comparadas entre os grupos de gestantes pelo teste de ANOVA. As associações entre dados qualitativos e quantitativos foram realizados também pelo teste de Correlação Ponto Bisserial em que as variáveis nominais foram designadas de escores numéricos. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Dados gerais das amostras analisadas**

A idade média das gestantes foi de  $23.4 \pm 5.4$  anos de vida, 24 eram leucodermas e 19 melanodermas. A maioria possuía baixa escolaridade indicando não terem finalizado o Ensino Fundamental I. A renda familiar média foi de R\$  $1.334,00 \pm 649,00$  perfazendo um pouco acima de dois salários mínimos (em 2011, no estado de São Paulo o salário mínimo era de R\$ 600,00). O parto vaginal foi realizado em 34 gestantes sendo que as demais (n=9) realizaram cesariana. A idade gestacional média foi de  $39,4 \pm 1.8$  semanas. Dezenove frequentavam regularmente o dentista, sendo que 16 alegaram terem feito acompanhamento odontológico durante o período gestacional. A média do número de escovações dos dentes, durante um dia, foi de  $2,7 \pm 0.8$  vezes. Vinte e três alegaram ter sangramento durante a escovação. Destas, 15 tiveram foram consideradas portadoras de gengivite no exame clínico oral.

### **4.2. Dados socioeconômicos e clínicos entre pacientes com e sem gengivite**

Não houve associações entre os grupos de gestantes com ou sem gengivite quanto ao tipo de parto e raça (Tabela 2,  $p>0,05$ ). A renda média das gestantes com gengivite foi de R\$  $1106,3 \pm 431,7$  e das ausentes da doença foi de  $1487,0 \pm 708,6$  ( $p>0,05$ ). A idade média das gestantes foi de  $25,1 \pm 4,4$  e  $22,6 \pm 5,9$  para as com gengivites e sem a doença respectivamente ( $p>0,05$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa na idade gestacional ao nascimento entre as diagnosticadas ou não com a doença ( $p>0,05$ ).

**Tabela 2.** Frequência de gestantes portadoras ou não de gengivite gravídica de acordo com tipo de parto e raça (n = 43).

Dados	Gengivite n=15	Sem gengivite n=28	Total n=43	p
<b>Tipo de Parto</b>				
Cesariana	3	6	9	1.00
Vaginal	12	22	34	
<b>Raça</b>				
Leucodermas	8	16	24	1.00
Melanodermas	7	12	19	

Com exceção do sangramento gengival que foi mais detectável nas gestantes com a doença gengival (Tabela 3,  $p=0,00$ ) os demais dados coletados sobre saúde oral e hábitos de higiene não foram associados com a detecção ou não da gengivite (Tabela 3,  $p>0,05$ ).



**Tabela 3.** Frequência de gestantes portadoras ou não de gengivite relacionado com quantidade de escovação diária, tratamento odontológico durante a gestação, presença de sangramento gengival e assiduidade nas visitas ao dentista (n = 43).

Dados	Gengivite n=15	Sem gengivite n=28	Total n=43	p
<b>Escovação (em um dia)</b>				
mais de 3 vezes	9	16	25	0.89
de 1 a 2 vezes	6	12	18	
<b>Tratamento odontológico durante a gestação</b>				
Sim	4	12	16	0.34
Não	11	16	27	
<b>Sangramento</b>				
Sim	15	8	23	0.00
Não	0	20	20	
<b>Visita frequente ao dentista</b>				
Sim	6	13	19	0.93
Não	9	15	24	

#### 4.3. Detecção de Pg nas amostras e dados obtidos no questionário e no exame clínico

Houve uma associação significativa entre a presença do micro-organismo e a doença gengival em todas as amostras analisadas (Tabela 4,  $p < 0,05$ ). A análise das frequências de amostras positivas para Pg mostrou que das gestantes com gengivite (n=15), 60% apresentaram a bactéria no SP e SC, e 46,6% transferiram para o C. As análises da detecção de Pg nas amostras salivares mostraram que seu ADN foi encontrado em todas as amostras das pacientes com gengivite (Tabela 4). Dentre as gestantes saudáveis periodontalmente, cerca de 32.1%

apresentaram Pg na saliva, mas nenhuma apresentou tal bactéria das demais amostras sanguíneas (Figura 4).

Não houve associação entre os dados coletados no questionário (raça, tipo de parto, visitas ao dentista, tratamento odontológico durante a gestação, número de escovações durante o dia, tipo de parto) e presença de Pg nas amostras analisadas ( $p>0,05$ ).

Não houve diferenças estatisticamente significantes ( $p>0,05$ ) na intensidade de fluorescência emitida em CT nas amostras de SA e C ( $29,10 \pm 3,79$ ,  $28,2 \pm 10,0$  respectivamente) nos pacientes com gengivite. Também não houve diferença na intensidade de fluorescência detectada na SA ( $29,25 \pm 5,87$ ) entre os grupos de pacientes sem a doença. Nas amostras sanguíneas as intensidades de fluorescência foram em média menores (e parecidas entre si,  $p>0,05$ ) que nas demais amostras ( $16,83 \pm 14,77$  e  $14,88 \pm 13,51$ , respectivamente para SP e SC) mas não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ( $p>0,05$ ).

**Tabela 4.** Frequência de detecção de Pg em amostras de saliva (SA), de sangue periférico (SP), de sangue do cordão (SC) e de colostro (C) relacionado à presença ou não de gengivite gravídica (n = 43).

<b>Detecção de Pg nas amostras de:</b>	<b>Gengivite n=15</b>	<b>Sem gengivite n=28</b>	<b>Total n=43</b>	<b>p</b>
<b>SA</b>				
Positiva	15	9	24	0.00
Negativa	0	19	19	
<b>SP</b>				
Positiva	9	0	9	0.00
Negativa	6	28	32	
<b>SC</b>				
Positiva	9	0	9	0.00
Negativa	6	28	32	
<b>C</b>				
Positiva	7	0	25	0.00
Negativa	8	28	18	

**Figura 4.** Diagrama esquemático que evidencia a presença de Pg (representada pelos retângulos coloridos) na saliva (SA), sangue periférico (SP), sangue do cordão (SC) e colostro (C) nas gestantes portadoras (1 a 15) ou não (16 a 43) de gengivite. As imagens coloridas representam a detecção positiva de Pg na SA em verde, no SP em laranja, no SC em amarelo e C em azul.

Amostra	SA	SP	SC	C
1	■	□	□	□
2	■	□	□	□
3	■	□	□	□
4	■	□	□	□
5	■	■	■	■
6	■	□	□	□
7	■	■	■	■
8	■	■	■	□
9	■	■	■	□
10	■	■	■	■
11	■	□	□	□
12	■	■	■	■
13	■	■	■	■
14	■	■	■	■
15	■	■	■	■
16	□	□	□	□
17	□	□	□	□
18	□	□	□	□
19	■	□	□	□
20	□	□	□	□
21	□	□	□	□
22	□	□	□	□
23	□	□	□	□
24	■	□	□	□
25	■	□	□	□
26	□	□	□	□
27	■	□	□	□
28	□	□	□	□
29	■	□	□	□
30	□	□	□	□
31	□	□	□	□
32	■	□	□	□
33	■	□	□	□
34	□	□	□	□
35	□	□	□	□
36	■	□	□	□
37	■	□	□	□
38	□	□	□	□
39	□	□	□	□
40	□	□	□	□
41	□	□	□	□
42	□	□	□	□
43	□	□	□	□

#### 4.4. Detecção de Aa nas amostras e dados obtidos no questionário e no exame clínico

Não houve associação entre os dados coletados no questionário (raça, tipo de parto, visitas ao dentista, tratamento odontológico durante a gestação, número de escovações durante

o dia) e presença de Aa nas amostras analisadas ( $p>0,05$ ). No entanto, houve uma associação significativa entre a presença do micro-organismo e a doença nas amostras de SA e C (Tabela 5,  $p<0,05$ ). Nenhuma amostra de SP e SC apresentaram a bactéria em níveis detectáveis.

As análises da detecção de Aa nas amostras mostraram que esta bactéria foi encontrada em todas as amostras de SA das pacientes com gengivite. Dentre as gestantes saudáveis periodontalmente, cerca de 32,1% apresentaram níveis detectáveis na SA da bactéria. Com exceção das 9 gestantes sem a doença, que foram positivas para a detecção de Aa na saliva, nenhuma das outras amostras (SP, SC e C) apresentou a bactéria (Figura 5). Sete amostras de gestantes portadoras da doença (46,6%) apresentaram a bactéria em C (sendo as mesmas mães que apresentaram Pg) e não nas amostras de sangue (Tabela 5).

Não houve diferenças estatisticamente significantes ( $p>0,05$ ) na intensidade de fluorescência emitida em CT nas amostras de SA e C ( $29,08 \pm 3,78$ ,  $28,22 \pm 9,89$  respectivamente) nos pacientes com gengivite. Também não houve diferença na intensidade de fluorescência detectada na SA entre os grupos de pacientes ( $28,13 \pm 10,02$  em pacientes sem a doença).

**Tabela 5.** Frequência de detecção de Aa em amostras de saliva (SA), de sangue periférico (SP), de sangue do cordão (SC) e de colostro (C) relacionado à presença ou não de gengivite gravídica (n = 43).

<b>Detecção de Aa nas amostras de:</b>	<b>Gengivite n=15</b>	<b>Sem gengivite n=28</b>	<b>Total n=43</b>	<b>p</b>
<b>SA</b>				
Positiva	15	9	24	0.00
Negativa	0	19	19	
<b>SP</b>				
Positiva	0	0	0	1.000
Negativa	15	28	32	
<b>SC</b>				
Positiva	0	0	0	1.000
Negativa	15	28	32	
<b>C</b>				
Positiva	7	0	7	0.00
Negativa	8	28	36	

**Figura 5.** Diagrama esquemático que evidencia a presença de Aa (representada pelos retângulos coloridos) na saliva (SA), sangue periférico (SP), sangue do cordão (SC) e colostro (C) nas gestantes portadoras (1 a 15) ou não (16 a 43) de gengivite. As imagens coloridas representam a detecção positiva de Pg na SA em verde, no SP em laranja, no SC em amarelo e C em azul.

Amostra	SA	SP	SC	C
1	■	■	■	■
2	■	■	■	■
3	■	■	■	■
4	■	■	■	■
5	■	■	■	■
6	■	■	■	■
7	■	■	■	■
8	■	■	■	■
9	■	■	■	■
10	■	■	■	■
11	■	■	■	■
12	■	■	■	■
13	■	■	■	■
14	■	■	■	■
15	■	■	■	■
16	■	■	■	■
17	■	■	■	■
18	■	■	■	■
19	■	■	■	■
20	■	■	■	■
21	■	■	■	■
22	■	■	■	■
23	■	■	■	■
24	■	■	■	■
25	■	■	■	■
26	■	■	■	■
27	■	■	■	■
28	■	■	■	■
29	■	■	■	■
30	■	■	■	■
31	■	■	■	■
32	■	■	■	■
33	■	■	■	■
34	■	■	■	■
35	■	■	■	■
36	■	■	■	■
37	■	■	■	■
38	■	■	■	■
39	■	■	■	■
40	■	■	■	■
41	■	■	■	■
42	■	■	■	■
43	■	■	■	■

A análise comparativa entre as cepas microbianas mostra que detecção positiva tanto de Pg quanto de Aa aconteceu nas mesmas amostras, tanto em SA de doentes gengivais (amostras

de 1 a 15, Figuras 4 e 5) quanto nas gestantes sem gengivite (amostras 19, 24, 25, 27, 29, 32, 33, 36 e 37, Figuras 4 e 5). O mesmo aconteceu nas amostras de colostro das com gengivite (amostras 5, 7, 10, 12 a 15, Figuras 4 e 5).



## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo buscou analisar a presença e a ausência de Pg e Aa em amostras de sangue periférico, colostro e saliva maternos, e de sangue do cordão umbilical de gestantes diagnosticadas com gengivite ou não e que não apresentaram intercorrências durante a gestação e ainda, comparar os dados obtidos com informações sócio-econômicas e de saúde oral.

A escolha das espécies 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 ADN de Pg e Aa nas cepas padrão, bem como nas amostras testadas. A utilização de qPCR é uma prática previamente testada e efetiva para detecção destas espécies bacterianas (Periasamy & Kolenbrander, 2009; Urban *et al.*, 2010). Além disto, os primers utilizados 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).

As amostras foram derivadas de um estudo amplo que contou com a coleção de 416 conjuntos de amostras salivares e sanguíneas de gestantes admitidas na MATER, em que todas foram examinadas clinicamente e dados de saúde oral e gestacional colecionados. De modo geral, eram gestantes de renda mínima e nível de escolaridade baixo e que não apresentaram intercorrências durante a gestação e nem tiveram filhos de baixo peso ao nascer. Deste grupo, 18 gestantes tinham a gengivite e 4 apresentavam periodontite crônica. Este número de gestantes com a doença periodontal está de acordo com os parâmetros de prevalência da doença, disponíveis na literatura, que é de aproximadamente 4,7% de diagnóstico positivo para mães cujos filhos tiveram peso normal ao nascer (Offenbacher *et al.*, 1996). Das portadoras de gengivite, 15 amostras foram analisadas no presente estudo, pois tinham material genético extraído em boas condições para o uso e tinham todas as amostras coletadas.

Cruz e col., 2005, estabelece uma forte associação entre a presença da gengivite e baixas condições socioeconômicas e dificuldade de acesso aos serviços de saúde, bem como a comportamentos relacionados à saúde como: tabagismo, alcoolismo, dieta rica em carboidratos e higiene bucal deficiente (Cruz *et al.*, 2005). Os resultados obtidos não permitiram estabelecer tais associações entre o diagnóstico da doença e dados socioeconômicos e comportamentais. Quanto a higiene, a maioria afirmava escovar mais de três vezes ao dia, mas não houve associação entre as que escovavam menos vezes e serem portadoras da doença.

Os resultados mostraram que todas as amostras salivares de pacientes com gengivite apresentaram Pg e Aa, como encontrado em estudos prévios (Van Winkelhoff *et al.*, 1996; Casarin *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2017). 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=9, 32,1%) sem a gengivite instalada, níveis detectáveis de Pg e Aa nas amostras salivares. Uma relação simbiótica entre a microbiota oral residente, que pode incluir peridontopatógenos, 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).

A gengivite no período gestacional é uma situação muito comum 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 presença de Pg nas amostras sanguíneas também foi associada à presença de gengivite, já que 60% das gestantes com gengivite apresentaram Pg no SP e no SC. A presença de Pg na circulação periférica materna é uma situação bem descrita na literatura, isto porque nos casos de gengivite e periodontite, o biofilme subgengival está em estreita proximidade com o tecidos marginais gengivais inflamados, 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). Esta bacteremia transitória foi encontrada após escovação de pacientes com gengivite usando técnicas de cultivo (Marin *et al.*, 2016). 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).

A presença de Pg no SC, 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).

A presença de bactérias orais na placenta, associadas à doença periodontal, como *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus spp* foram descritas em mulheres que tiveram partos prematuros (Bearfield *et al.*, 2002; Vanterpool *et al.*, 2016). Por outro lado, Blanc e

colaboradores (2015) não encontraram Aa e Pg em amostras placentárias de mães com periodontite e nascimentos prematuros (Blanc *et al.*, 2015). Vanterpool e colaboradores (2016) mostraram que a presença de *Porphyromonas gingivalis* e seu envolvimento com o nascimento prematuro depende do local de instalação do micro-organismo, ou seja, ele deve estar presente no estroma do tecido placentário e no cordão umbilical de gestantes. Os mesmos autores não encontraram em gestações a termo, a presença de Pg nestes locais (Vanterpool *et al.*, 2016). Os nossos resultados mostraram evidências da presença de Pg em 21% das amostras de sangue do cordão e provavelmente não levaram ao nascimento prematuro por não estarem presentes nos tecidos placentários e por estarem em quantidades insuficientes para estimular uma resposta inflamatória local, como ocorre principalmente nas periodontites e que tem uma grande correlação com nascimentos prematuros (Offenbacher *et al.*, 2006)

Além dos relatos de infecção bacteriana em placentas de mães com complicações durante a gravidez, alguns autores descrevem a colonização bacteriana intracelular placentária em gestação a termo (Stout *et al.*, 2013). Recentemente, a análise metagenômica de espécimes placentários tem revelado a existência de um microbioma na placenta, com perfis taxonômicos semelhantes aos descritos no ambiente oral, onde bactérias periodontopatógenas estão relativamente abundantes em placentas de gravidezes saudáveis (Aagaard, 2014; Prince *et al.*, 2014). Nossos resultados são consistentes com esses fatos. Apesar de que Blanc *et al.* não tenham encontrado Aa e Pg, os autores encontraram bactérias orais como *A. israelii* e *F. nucleatum* em mais de 27% dos espécimes placentários de mães a termo, sem a doença periodontal (Blanc *et al.*, 2015).

Desta maneira, a presença de Pg no SC em gestações a termo nos permite aceitar o estado portador assintomático (Katz *et al.*, 2006), sendo que as complicações durante a gestação podem ser fruto de alterações na microbiota placentária e na quantidade de micro-organismos

locais, ou seja, os níveis de certos patógenos orais na placenta dependerão muito do estado periodontal da mãe (Blanc *et al.*, 2015).

Assim como as amostras de sangue e salivares, o colostro de algumas gestantes com gengivite também apresentaram *Pg* em níveis detectáveis. Os resultados revelaram que *Pg* e *Aa* estiveram presentes no colostro de 46% das gestantes com gengivite. A presença de *Pg* além do colostro ocorreu no SP, SC e SA. O caminho de entrada de bactérias nas glândulas mamárias e leite humano ainda não está claro. Há hipóteses de que as bactérias possam estar nas glândulas mamária por contaminação de fora, ou por dentro, através de uma via êntero bacteriana, ou ainda, por uma associação entre ambas as vias (Jost *et al.*, 2015). A contaminação de fora pode ocorrer pelo contato com a pele e transferência da microbiota bucal neonatal durante a amamentação (Ramsay & Hartmann, 2005). Isso pode explicar a predominância no leite humano de *Staphylococcus* e *Streptococcus* que são comensais típicos da microbiota cutânea e oral (Bik *et al.*, 2010; Kong & Segre, 2012) respectivamente. No entanto, a coleta das amostras do presente estudo, foi realizada antes da primeira mamada do neonato o que não permite a ocorrência da contaminação durante o aleitamento do bebê. Uma outra hipótese para explicar a presença de micro-organismos no colostro seria a via êntero bacteriana, em que micro-organismos saem do intestino materno por internalização em leucócitos (como por exemplo, células dendríticas) que migram para a via linfática e a circulação sanguínea, alcançando as glândulas mamárias em lactação (Martin-Sosa *et al.*, 2004; Jost *et al.*, 2014), o que justifica a presença de ADN de *Pg* e *Aa* em uma parte das amostras.

## 6. CONCLUSÕES

Diante do exposto, podemos concluir que:

- O presente estudo vem reforçar a teoria de que há bactérias ou parte delas circulantes no sangue periférico e sangue do cordão umbilical, sem causar uma interrupção da gestação precocemente. Pg e Aa foram detectadas na maioria das amostras salivares. Pg foi encontrada em uma minoria das amostras sanguíneas, enquanto que nenhuma amostra de sangue teve Aa detectável. Aa e Pg foram detectadas em uma pequena parcela de amostras do colostro.
- Aa e Pg foi encontrada na SA de todas gestantes que apresentavam gengivite. A maioria das mulheres com gengivite apresentaram Pg no SP e no SC, o que não aconteceu para Aa. No colostro, a presença de ambas bactérias esteve relacionada com o diagnóstico positivo da doença gengival.
- Não houve associação entre o diagnóstico da doença, presença do micro-organismo e dados socioeconômicos e comportamentais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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 Periodontol Res**, v. 45, n. 5, p. 635-42, Oct 2010.

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.

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.
- HOOPEER, 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.

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.

RABER-DURLACHER, J. E. et al. Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: 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.

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.

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.

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.

## ANEXO – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



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.

  
**DR<sup>a</sup> MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

**RUCHELE DIAS NOGUEIRA**

**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. VIRGÍNIA PAES LEME FERRIANI(Supervisora)**

Depto. de Puericultura e Pediatria

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário  
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4  
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br  
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

## APÊNDICE – Questionário

### QUESTIONÁRIO

Prematuro: Não  Sim

Maternidade: _____	Data: ____/____/____	N <sup>o</sup> . ficha: _____
Nome do bebê: _____		
Nome da Mãe: _____	nasc: ____/____/____	
Nome do Pai: _____	nasc: ____/____/____	
Endereço: _____		
Telefone para contato: _____		

#### DADOS MATERNOs

1. Perfil racial: 1. ( ) branco 2. ( ) negro 3. ( ) mulato 4. ( ) amarelo 5. ( ) índio 6. ( ) outros \_\_\_\_\_
2. Grau de instrução da mãe: 1. ( ) sem escolaridade 2. ( ) 1º grau completo 3. ( ) 1º grau incompleto  
4. ( ) 2º grau completo 5. ( ) 2º grau incompleto 6. ( ) superior
3. Renda familiar: R\$ \_\_\_\_\_/mês
4. Qual foi o tipo de parto? 1. ( ) cesária 2. ( ) normal
5. Qual o tempo de gestação? \_\_\_\_\_ semanas
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, o motivo? \_\_\_\_\_
9. Freqüente regularmente o dentista? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não Se sim, quando foi a última?  
\_\_\_\_\_
10. Apresenta dor em algum dente? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não Qual?  
\_\_\_\_\_
11. Quantas vezes você escova os dentes por dia? ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) 4 ou mais
12. Seus dentes sangram durante a higiene? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não
13. Possui próteses dentais? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não Tipo: \_\_\_\_\_

#### DADOS DA CRIANÇA RECÉM NASCIDA

- dia(s) de vida: \_\_\_\_\_ Idade gestacional: \_\_\_\_\_ semanas
- Data nasc.: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Sexo: ( ) F ( ) M Peso: \_\_\_\_\_ Kg Estatura: \_\_\_\_\_ cm
1. Perfil racial: 1. ( ) branco 2. ( ) negro 3. ( ) mulato 4. ( ) amarelo 5. ( ) índio 6. ( ) outros \_\_\_\_\_
  2. Amamenta ou amamentou seu filho(a)? 1. ( ) Sim 2. ( ) Não