

ELIZETE DA ROCHA VIEIRA DE BARROS

**AVALIAÇÃO DAS RELAÇÕES DE PREMATURIDADE E
DOENÇA PERIODONTAL ATRAVÉS DA DETECÇÃO DE DNA
GENÔMICO DE *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* E
AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS EM BIOFILME
BUCAL MATERNO E TECIDO PLACENTÁRIO**

CAMPO GRANDE
2014

ELIZETE DA ROCHA VIEIRA DE BARROS

**AVALIAÇÃO DAS RELAÇÕES DE PREMATURIDADE E DOENÇA
PERIODONTAL ATRAVÉS DA DETECÇÃO DE DNA GENÔMICO DE
PORPHYROMONAS GINGIVALIS E *AGGREGATIBACTER*
ACTINOMYCETEMCOMITANS EM BIOFILME BUCAL MATERNO E
TECIDO PLACENTÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, para obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Almir de Sousa Martins
Co-orientador: Prof. Dr. Durval Batista
Palhares

CAMPO GRANDE
2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

ELIZETE DA ROCHA VIEIRA DE BARROS

**AVALIAÇÃO DAS RELAÇÕES DE PREMATURIDADE E DOENÇA
PERIODONTAL ATRAVÉS DA DETECÇÃO DE DNA GENÔMICO DE
PORPHYROMONAS GINGIVALIS E *AGGREGATIBACTER*
ACTINOMYCETEMCOMITANS EM BIOFILME BUCAL MATERNO E TECIDO
PLACENTÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para
obtenção do título de Doutor.

Resultado_____

Campo Grande (MS) _____ de _____ de _____..

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir de Sousa Martins
UFMG- MG

Prof. Dr. Pedro Alves Campos
PUC-MG

Prof. Dr. Durval Batista Palhares
FAMED- UFMS

Prof. Dra Anna Maria Duarte Miglioli
FAMED-UFMS

Prof. Dra. Carmen Martinbianco
FAMED- UFMS

Prof. Dra. Paula Cristhina Niz Xavier
FAMED-UFMS

Amados filhos
Ana Carolina e Guilherme

*Deixo dedicado a vocês este trabalho, que compreendem e vivem
cotidianamente este meu encantamento pelo mundo fantástico do conhecimento.*

Que seja incentivo para a vida!

DEDICATÓRIAS ESPECIAIS

A Deus, nosso criador, pelo dom da vida e por estar sempre comigo, iluminando meu coração e guiando os meus passos. “Aparte-se do mal, e faça o bem; Busque a paz, e siga-a”. Amém! 1º Pedro 3-1

Ao meu marido, Carlos Tadeu Xavier de Barros, companheiro de uma vida toda, por embarcar neste sonho individual, compreendendo as ausências e apoiando a caminhada.

A minha mãe Vivi e meu pai João (in memoriam), exemplo de pais amorosos e íntegros, a quem devo o apoio e estímulo desde muito cedo para os estudos, que a cada passo, me retribuíam com aquele brilho no olhar, de pais orgulhosos e prontos para mais uma conquista. Obrigada pelo amor incondicional! Guardo-os no coração!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu ilustre Orientador, Prof. Dr. Almir de Sousa Martins, homem de grande capacidade intelectual, um exemplo de pessoa humana, professor e pesquisador. Serei eternamente grata pelo meu aceite como sua orientada. Obrigada pelo conhecimento, orientação, paciência, e dedicação destes últimos quatro anos. A competência que o acompanha, com certeza, permitiu o desenvolvimento desta tese. Agradeço pela oportunidade única e convivência!

*“Ensinar é um exercício
de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a
ver o mundo pela magia da nossa palavra.
O professor, assim, não morre
jamais”...
Rubem Alves*

AGRADECIMENTOS

A Secretaria Municipal de Saúde de Campo Grande – MS, especialmente na pessoa do Secretário Municipal de Saúde, Jamal Mohamed Salem e Secretário Adjunto, Gilmar Trevisan, por valorizar os recursos humanos dos seus quadros, concedendo-me a licença para esta conclusão. Que esta tese possa possibilitar o exercício da “praxis”, tão buscada para a eficiência técnica dos serviços, contribuindo para a atenção à saúde da mulher e da criança!

Ao grande incentivador do tema desta tese, Prof. Dr. Durval Batista Palhares, médico com uma visão integral da saúde muito apurada. Obrigada pelo acolhimento do primeiro dia, quando sem me conhecer, acreditou que o foco desta temática tinha consistência e o seu desenvolvimento era importante para entendimento da prematuridade. Obrigada pela disponibilidade, conhecimento e apoio durante todo este período!

A Prof. Dra Laís Alves de Sousa, que especialmente incentivou e indicou caminhos para materializar este projeto. Poucas pessoas agem de forma tão desinteressada e ética. Que continue assim, incentivando o conhecimento!

A todas as mães que colaboraram com seu consentimento. Saibam que o compromisso desta pesquisa permeia o desdobramento para a prática, que possa ampliar o nosso conhecimento e cuidado na gestação.

Aos residentes da Enfermagem Obstétrica, especialmente Dayanne Kalassa Barbosa do Nascimento e Carlos Alberto da Silva Castro, por participarem diretamente na coleta do material deste trabalho. A disponibilidade e o interesse os tornaram especiais, e certamente atitudes como esta os diferenciarão na profissão. Meninos, o futuro os espera, continuem assim!

A minha grande companheira de trabalho, Neize dos Reis de Almeida, que ajudou na esterilização de todo material odontológico utilizado nesta pesquisa, sempre com cuidado e atenção. É um prazer trabalhar contigo!

Aos doutorandos da UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais, Fabiana Alves e Francisco de Oliveira Vieira, que não mediram esforços em trabalhar na fase laboratorial deste trabalho, mesmo estando envolvidos com as suas pesquisas. O interesse, a disposição, o compromisso e competência foram essenciais para que esta tese fosse finalizada. Agradeço também o acolhimento humano enquanto estive aí no campus da UFMG. A vocês, o meu muito obrigada!

A Prof. Dra. Anna Maria Duarte Miglioli, que contribuiu para a liberação do seu arquivo de pesquisa e material coletado, obrigada pelo incentivo, ajuda e estímulo para novas descobertas. O seu apoio fez a diferença!

A Prof. Dra Paula Cristhina Niz Xavier, que acompanhou toda a fase laboratorial desenvolvida aqui em Campo Grande, pelos ensinamentos e pelo fazer juntos. Agradeço de coração a sua ajuda e disposição!

Ao amigo, Adélio Guimarães, por colaborar com grande empenho na formatação deste trabalho e participar com sua boa vontade e dedicação, meu reconhecimento!

As minhas amigas, Fabiane Neves e Magda Mareco, por serem partícipes da minha vida profissional e ainda que passem os anos, serão para sempre a “minha equipe de trabalho”, que durante esta caminhada foram incentivadoras nas conquistas, mas sobretudo, nas adversidades, a convivência com vocês me faz melhor!

Agradeço a todos que direta ou indiretamente foram partícipes desta caminhada, que aqui estão anônimos, mas que fizeram a diferença para que este projeto de vida e profissional fosse consolidado.

A todos, eterna gratidão!

O inesperado surpreende-nos...

É que nos instalamos de maneira segura em nossas teorias e ideias, e estas não tem estrutura para acolher o novo. Entretanto, o novo brota sem parar. Não podemos jamais prever como se apresentará, mas deve-se esperar sua chegada, ou seja, esperar o inesperado.

E quando o inesperado se manifesta, é preciso ser capaz de rever nossas teorias e ideias, ao invés de deixar o fato novo entrar à força na teoria incapaz de recebê-lo.

Edgar Morin

RESUMO

BARROS ERV. Avaliação das relações de prematuridade e doença periodontal através da detecção de DNA genômico de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em biofilme bucal materno e tecido placentário. **Campo Grande; 2014. [Tese – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].**

A doença periodontal engloba uma série de alterações que ocorrem no periodonto a partir da formação do biofilme dental, caracterizado pela presença de uma gama de micro-organismos. Alguns destes, pelas suas características singulares, são fortemente associados à patologia, tais como *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. O objetivo deste trabalho foi avaliar as relações de prematuridade e doença periodontal através da detecção de DNA genômico de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em biofilme bucal materno e tecido placentário. Para isto foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para a detecção dos genes da RNA polimerase de *Porphyromonas gingivalis* e leucotoxina de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* como alvos para amplificação por PCRtr, a partir de biofilme de exsudato de sulco gengival materno, tecido placentário e sangue de cordão umbilical de 19 mulheres em situação de parto prematuro. Realizou-se também a triagem por PCRtr de 64 amostras arquivadas de DNA genômico de placentas de mães de bebês com suspeita de infecção neonatal. Como genes normalizadores utilizou-se β -actina para amostras de DNA e S26 para amostras de RNA. Para confirmação e avaliação da presença e viabilidade bacteriana, foram realizados estudos de RT-PCRtr para determinar a expressão dos mRNAs que codificam a RNA polimerase da *Porphyromonas gingivalis* e a leucotoxina do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a partir de RNA total de tecido placentário, adicionados a uma avaliação por microscopia confocal de amostras de tecido placentário PCRtr positivas. Os resultados demonstraram que os *primers* selecionados foram eficientes e específicos para diagnóstico e estudos de expressão por PCRtr e todos os espécimes pesquisados foram viáveis para a detecção de DNA genômico dos micro-organismos investigados. A PCRtr detectou *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em torno de 15%, nos três espécimes, entretanto, as amostras de biofilme das mães apresentaram o maior percentual de 16,7%. A avaliação periodontal realizada apontou que 50% das mulheres apresentavam sangramento gengival, 83% cálculo e 17% bolsa periodontal. A prevalência de *Porphyromonas gingivalis* foi elevada nos espécimes estudados com 100% no sangue de cordão umbilical, 95% no tecido de hilo placentário e 83% nos biofilmes de sulco gengival materno. A triagem por PCRtr de 64 amostras arquivadas de DNA genômico específicos da placenta, reforçou os achados de prevalência da *Porphyromonas gingivalis* demonstrando 32 (50%) positivas e 2 (3,1%) positivas para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. A RT-PCRtr de RNA total das 19 placentas avaliadas, apresentou Leucotoxina da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em 5 (31%) amostras, e 12 (75%) apresentaram a expressão de RNA polimerase específica da *Porphyromonas gingivalis*. Estes achados mostram que nas placentas PCRtr positivas existe uma grande porcentagem de bactérias viáveis expressando proteínas relevantes para sua proliferação. Os dados de microscopia confocal reforçam esta descoberta, sugerindo a presença de material genético bacteriano, pela consistente formação de vacúolos significativos de bactérias e material genético extra-nuclear. Os resultados obtidos das diferentes metodologias aplicadas nos espécimes avaliados demonstram uma importante relação de prematuridade e doença periodontal materna.

Palavras-chaves: Doença periodontal, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, prematuridade, PCR em tempo real, expressão gênica

ABSTRACT

BARROS ERV. Assessment of relative preterm birth and periodontal disease by detecting genomic DNA of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in oral biofilm maternal and placental tissue. Campo Grande; 2014 [Thesis – Federal University of Mato Grosso do Sul].

Periodontal disease includes a number of changes that occur in the periodontium from the formation of biofilm, characterized by the presence of a range of microorganisms. Some of these, by their unique characteristics, are strongly associated with disorders such as *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. The aim of this study was to evaluate the relationship of preterm birth and periodontal disease by detecting genomic DNA of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in oral biofilm maternal and placental tissue. For these purposes, oligonucleotide primers were designed for the detection of RNA polymerase gene of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin as targets for PCRtr amplification from mouth exudate biofilm of the gingival sulcus, placenta and umbilical cord blood, 19 women experiencing preterm labor. Also held a screening for PCRtr 64 archived samples of genomic DNA from placentas of mothers of infants with suspected neonatal infection. As normalization genes, it was used B-actin, for DNA samples and S26 for RNA. To confirm and evaluate both presence and bacterial viability, RT-PCRtr was applied to determine mRNA expression of RNA polymerase from *Porphyromonas gingivalis* and leukotoxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, in total RNA from placenta. Additionally, confocal microscopy of placenta tissues PCRtr positives, were also investigated. The results demonstrated that primers were efficient and specific for the diagnosis and expression studies and all specimens studied were viable for the detection of genomic DNA of microorganisms investigated. The PCRtr detected *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, around 15%, in the three specimens, however, the biofilm samples of the mothers had the highest percentage of 16.7%. A periodontal evaluation conducted found that 50% of women had bleeding gums, calculating 83% and 17% periodontal pocket. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* was elevated in the specimens studied, 100% in umbilical cord blood, 95% in the placental hilus and 83% of biofilms of maternal gingival sulcus. PCRtr screening of 64 archived samples of placental genomic DNA, reinforced the findings of prevalence of *Porphyromonas gingivalis*, demonstrating 32 (50%) positive and 2 (3.1%) positive for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. RT-PCRtr of total RNA from placenta presented 5 (31%) samples with Leukotoxin mRNA expression of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and 12 (75%) showed the expression of the RNA polymerase specific for the *Porphyromonas gingivalis*. These findings show that in the PCRtr positive placentas a large percentage of viable bacteria are expressing relevant proteins for their proliferation. The confocal microscopy data reinforce these findings, suggesting the presence of bacterial genetic material by consistent formation of vacuoles, significant bacteria and extra-nuclear genetic material. The results obtained from the different methodologies applied in specimens evaluated, demonstrate a significant relation of prematurity with maternal periodontal disease.

Keywords- periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, prematurity, Real time PCR, gene expression;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição do número de artigos relacionados na base PubMed a doença periodontal, por continente, entre os anos 2010 a 2012.	22
Figura 2 - Número de artigos da base PubMed de 2010 a 2012, relacionando doença periodontal e micro-organismos (<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>), gravidez e prematuridade.	24
Figura 3 - Fluxograma de coleta dos espécimes, Campo Grande-MS, 2014.....	48
Figura 4 - Oligonucleotídeos iniciadores e respectivos amplicons para detecção de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> através PCRtr.....	54
Figura 5 - Oligonucleotídeos iniciadores e respectivos amplicons para detecção de <i>Porphyromonas gingivalis</i> através de PCRtr..	54
Figura 6 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr. As letras A, B e C representam as curvas de amplificação dos fragmentos alvos para β -actina humana, Leucotoxina da <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> e RNA polimerase da <i>Porphyromonas gingivalis</i> , respectivamente, a partir de alíquotas de DNA genômico de placenta. D, E e F demonstram as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade dos <i>primers</i>	57
Figura 7 - Resultado típico de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata de PCRtr para diagnóstico em três espécimes de fontes diferentes. (B) β actina; (A) <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> e (P) <i>Porphyromonas gingivalis</i> . (M) marcador 50 pb DNA ladder. As amostras são de três pacientes distintos que apresentaram positividade para <i>Porphyromonas gingivalis</i> (Fragmento alvo de 72 pb). O fragmento de 254 pb da β actina é levemente observado em placenta e sulco gengival.	58
Figura 8 - Resultado típico de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata da PCRtr. (M) marcador 50 pb DNA ladder; (B) β -actina; (A) <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ; (P) <i>Porphyromonas gingivalis</i> . Os amplicons de 254 e 72 pb, para β -actina e <i>Porphyromonas gingivalis</i> , respectivamente, são demonstrados em exsudato de sulco gengival de uma mesma mãe.....	59

- Figura 9 - Resultado típico de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata da PCRtr. (M) marcador 50 pb DNA *ladder*; (B) β -actina; (A) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; (P) *Porphyromonas gingivalis*. O amplicon de 72 pb é demonstrado em todos os espécimes obtidos da mesma mãe60
- Figura 10 - Resultado típico de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata da PCRtr para diagnóstico de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*. (M) marcador 50 pb DNA *ladder*; (8 e 9) amostras de sangue de cordão umbilical, (21, 32) amostras da placenta e (37) exsudato de sulco gengival, apresentaram-se negativas. Amostra 34 de exsudato de sulco gengival de uma mãe apresentando positividade.....61
- Figura 11 - Resultado de detecção de β -actina por PCRtr em diferentes espécimes: (s) sangue de Cordão umbilical (n=13); (p) hilo placentário(n=19); (sg) exsudato de sulco gengival materno (n=12)e respectivos resultados positivos em percentuais, Campo Grande - MS, 201463
- Figura 12: Resultado de detecção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por PCRtr em diferentes espécimes; (s) sangue de Cordão umbilical (n=13); (p) hilo placentário (n=19); (sg) exsudato de sulco gengival materno (n=12) e respectivos resultados positivos em percentuais, Campo Grande - MS, 2014...65
- Figura 13 - Resultado de detecção de *Porphyromonas gingivalis* por PCRtr em diferentes espécimes; (s) sangue de Cordão umbilical (n=13) ; (p) hilo placentário (n=19); (sg) exsudato de sulco gengival materno (n=12) e respectivos resultados positivos em percentuais, Campo Grande - MS, 2014.....67
- Figura 14 - Avaliação periodontal materna (n=12) de sangramento, cálculo e bolsa e respectivos resultados positivos em percentuais, Campo Grande - MS, 2014...69
- Figura 15 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr. As figuras à esquerda representam as curvas de amplificação dos fragmentos alvos para Leucotoxina da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e RNA pol da *Porphyromonas gingivalis*, respectivamente, a partir de alíquotas de DNA genômico de placentas de pacientes com suspeita de infecção pre-natal selecionadas aleatoriamente (n=64). Os gráficos à direita mostram as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade dos primers.71

- Figura 16 – Resultados de detecção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* por PCRtr em amostras de arquivo de Miglioli, (2003) 72
- Figura 17 - Resultados típicos obtidos pela RT-PCRtr. As curvas de amplificação dos fragmentos alvos para S26 humano, Leucotoxina da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e RNA polimerase da *Porphyromonas gingivalis*, respectivamente de cima para baixo à esquerda, a partir de RNA total de placenta. As respectivas curvas de dissociação estão à direita e caracterizam a especificidade dos *primers*. 73
- Figura 18 - Expressão de mRNAs para Leucotoxina de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e RNA polimerase da *Porphyromonas gingivalis*, através de RT-PCRtr. (A) Comparação de expressão de mRNA para Leucotoxina entre amostras placentárias positivas para a presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. (B) Comparação de expressão de mRNA para a enzima RNA polimerase bacteriana da *Porphyromonas gingivalis*. As barras representam os valores relativos de expressão obtidos pelo método estatístico de $2^{(-\Delta Ct)}$ após correção com o RNA normalizador endógeno S26..... 74
- Figura 19 - Fotomicrografia confocal das vilosidades da placenta materna apresentando as células trofoblásticas e tecido conjuntivo. As setas vermelhas apresentam sinais de formação de vacúolo nas células trofoblásticas, em A, B e C, significativas quanto à presença de bactérias. As setas brancas indicam a presença de material genético extra-nuclear sugestivo de *Porphyromonas gingivalis*. As células foram coradas com phalloidin green para actina (cores verde e azul). O material genético foi corado com DAPI (4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida) e PI (Iodeto de Propídio) verde e vermelho. 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Oligonucleotídios iniciadores selecionados, tamanho (nt) e fragmento alvo (pb), para a detecção de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> e <i>Porphyromonas gingivalis</i> através de PCRtr, Campo Grande –MS, 2014.....	53
Tabela 2 -	Resultado de detecção de β -actina por PCRtr em diferentes espécimes, sangue do cordão umbilical (s), hilo placentário(p), exsudato do sulco gengival materno, Campo Grande – MS, 2014.....	62
Tabela 3 -	Resultado de detecção de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> por PCRtr em diferentes espécimes: (a) referência da amostra; (s) sangue de Cordão umbilical ; (p) tecido do hilo placentário; (sg) exsudato de sulco gengival materno, Campo Grande –MS, 2014.....	64
Tabela 4 -	Resultado de detecção de <i>Porphyromonas gingivalis</i> por PCRtr em diferentes espécimes: : (a) referência da amostra; (s) sangue de Cordão umbilical ; (p) tecido do hilo placentário; (sg) exsudato de sulco gengival materno, Campo Grande - MS, 2014.....	66
Tabela 5 -	Resultado da avaliação periodontal, código da mãe, e referência a presença (+), ausência (-) , não se aplica (#) quanto a sangramento, cálculo e bolsa periodontal, Campo Gande - MS, 2014.....	68
Tabela 6 -	Resultado da expressão dos mRNAs que codificam a leucotoxina do <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> e RNA polimerase da <i>Porphyromonas gingivalis</i> , a partir do RNA total de tecido placentário, por RT-PCRtr e respectivos resultados, Campo Grande- MS, 2014	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Número de artigos da base PubMed relacionados à doença periodontal, publicados entre 2010-2012, por continente.....	22
Quadro 2 - Resultado de detecção de β -actina, <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> e <i>Porphyromonas gingivalis</i> por PCRtr em diferentes espécimes, por amostra e expressão relativa da <i>Porphyromonas gingivalis</i> e avaliação periodontal materna de sangramento, cálculo e bolsa, Campo Grande-MS, 2014.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
β actina.....	Beta actina, controle endógeno normalizador
BOP	Índice de sangramento a sondagem
c-DNA	DNA complementar
CAL.....	Nível clínico de inserção
CDT.....	<i>Cytolethal distending toxin</i> , toxina distensora citotetal
CEP.....	Comitê de Ética em Pesquisa
CPI.....	Community Periodontal Index / Índice periodontal Comunitário
DNA	Desoxyribonucleic acid, Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Enzima desoxirribonuclease
Dntp	
Mix contendo desoxinucleotídeos, citosina (dCTP), guanina (dGTP), timina (dTDP) e adenina (dATP)	
DP	Doença periodontal
TNF/FNT	Tumor necrosis factor, Fator de necrose tumoral
H ₂ O	Molécula de água
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Ig.....	Immunoglobulin, Imunoglobulina
IL	Interleukin, Interleucina,
IP.....	Índice de placa
LPS	Lipopolissacarídeos
mL.....	Mililitro
mRNA.....	RNA mensageiro
mM	Milimolar
NaOH.....	Hidróxido de sódio
ng	Nanogramas
PCRrt ...	Polimerase Chain Reaction real time, Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol.....	Picomol

NaCl.....	Cloreto de Sódio
NaOH.....	Hidróxido de Sódio
NPBP	Prematuridade e/ou baixo peso ao nascer
PC	Periodontite crônica
PG	Prostaglandin, Prostaglandina
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PLBW	Preterm and low birth weight- Pré-termo e baixo peso ao nascer
PPT	Parto prematuro
PubMed	Banco de dados para pesquisa bibliográfica
PROM.....	Ruptura Prévia da membrana
PT	Parto à termo
RT-PCRtr	Transcrição reversa por Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RN.....	Recém-nascido
RNBP.....	Recém- nascido de baixo peso
RNA.....	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RT	Transcrição reversa
RTX	<i>Repeats in toxin</i> , Região C- terminais da proteína
SINASC	Sistema de Informação sobre Nascidos Vivos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T. forsythia</i>	<i>Tanerella forsythia</i>
Tris-HCl.....	Tris(hidroximetil aminometano - clorídrico)
SYBR-Green.....	Fluoróforo marcador para PCRtr
S26.....	Proteína ribossomal, utilizado como normalizador da reação de PCR
μL	Micro litros
Média Δ CT Delta.....	CT (valor da amostra normalizado pelo gene invariante)
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UFMG.....	Universidade Federal de Minas Gerais
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
WHO.....	World Health Organization, Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Publicações sobre a temática.....	21
2.2 Doença periodontal e associações à doenças sistêmicas.....	24
2.3 Relação doença periodontal e prematuridade.....	27
2.4 Micro-organismos relacionados.....	37
2.4.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	37
2.4.2 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	40
2.5 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real.....	43
2.6 Justificativa.....	44
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 Objetivo Geral.....	46
3.2 Objetivos Específicos.....	46
4 MATERIAL E MÉTODO.....	47
4.1 Gestantes.....	47
4.2 Coleta de Amostras.....	47
4.3 Extração do DNA genômico.....	48
4.4 Extração de RNA e DNA de Placenta.....	49
4.4.1 <u>Extração do RNA total e tratamento com DNase:</u>	49
4.4.2 <u>Extração do DNA genômico:</u>	49
4.5 PCR em tempo Real.....	50
4.5.1 <u>Oligonucleotídeos iniciadores específicos:</u>	50
4.5.2 <u>PCR em tempo real</u>	50
4.5.3 <u>Transcrição reversa (RT):</u>	51
4.6 Microscopia confocal.....	51
4.7 Análise estatística.....	52
5 RESULTADOS.....	53
5.1 Obtenção dos <i>primers</i> específicos.....	53
5.2 Resultados da PCRtr e avaliação.....	55
5.3 Resultados de RT-PCRtr e microscopia confocal.....	56
6 DISCUSSÃO.....	77
7 CONCLUSÃO.....	83
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXOS.....	103
APÊNDICES.....	107

1 INTRODUÇÃO

A prematuridade é caracterizada no Brasil como de alta prevalência. Está associada a cerca de 75% da mortalidade neonatal e representa a causa mais frequente de morbidade neonatal (FONSECA *et al.*, 1999; RADES *et al.*, 2004).

A incidência aumentou nas duas últimas décadas, constituindo-se num problema de saúde pública com consequências econômicas, de impacto social e repercussões importantes, devido às complicações para o parto e risco para o recém-nascido. Dado potencializado quando reconhecemos que para os bebês que sobrevivem, há ocorrência de incapacidades destes no decorrer da vida (SILVEIRA *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2008).

As principais causas associadas e consideradas clássicas como o consumo de álcool, drogas, fumo, hipertensão, diabetes, infecções genito-urinárias e histórias prévias de partos prematuros, ainda não elucidam todos os casos (SPALICCI *et al.*, 2000).

Considerando dados epidemiológicos, observa-se que 30 a 50% dos casos de prematuridade são desencadeados por infecção à distância (BITTAR; ZUGAIB, 1993).

Neste sentido, estudos atuais sugerem que a doença periodontal também consistiria em um fator associado à prematuridade e baixo peso ao nascimento. Fatores genéticos e ambientais estão associados a essa doença, mas os micro-organismos do biofilme dental são vitais neste processo (GRIGORIADOU *et al.*, 2010; STANDAR *et al.*, 2010).

O biofilme constitui-se como uma comunidade microbiana indefinida, associada à superfície do dente (WILDERER; CHARAKLIS, 1989). A cavidade oral é habitada por mais de 500 diferentes espécies de micro-organismos, muitos dos quais possuem alta virulência. Em condições normais de equilíbrio, existe um balanço ecológico. Porém, quando este equilíbrio é rompido, um aumento de crescimento dos micro-organismos pode ocorrer e tornar-se processo patológico.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, *Porphyromonas gingivalis* e outras bactérias podem estar presentes no periodonto e são únicos para a cavidade oral, e podem disseminar para outros locais do corpo, reforçando a tese da infecção focal de origem bucal (SLOTS; KAMMA, 2001).

Tais micro-organismos podem induzir a formação de substâncias que exigirão uma resposta imune e inflamatória do hospedeiro, produção de citocinas e outros mediadores químicos (ENGEBRETSON *et al.*, 2000).

A disseminação sanguínea destas citocinas ou dos próprios agentes microbianos levam à proposição de relações da doença periodontal às doenças sistêmicas e condições

particulares como a ocorrência de partos prematuros (OFFENBACHER *et al.*, 1996; DASANAYAKE, 1998; ZANATTA *et al.*, 2007; SLOTS; KAMMA, 2001; MC NICOL; ISRAELS, 2010).

Desta forma, a identificação da microbiota bucal, tem sido de suma importância, porém o uso e a utilidade dos métodos diagnósticos na identificação e quantificação destes periodontopatógenos ainda são buscados. As técnicas da biologia molecular para detecção de periodontopatógenos estão sendo atualmente propostas, e vem permitindo não somente adquirir conhecimento da genética microbiana, mas também fixar as bases para o desenvolvimento de técnicas diagnósticas, como a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCRtr). A PCRtr já foi utilizada para identificar alguns dos principais patógenos periodontais como: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, entre outros, sendo capaz de distinguir patógenos alvos de numerosas espécies presentes na boca (BEDRAN *et al.*, 2010).

Com base nestas premissas, este estudo objetivou a avaliação das relações de prematuridade e doença periodontal, através da detecção de DNA genômico de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em biofilme bucal materno e tecido placentário.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A pesquisa foi alvitada partindo da elaboração de artigo científico pela pesquisadora, versando sobre a problemática, que permitiu apontar as principais publicações quanto a origem, por continente, dos estudos entre os anos 2010 e 2012, na base PubMed que envolviam o tema, e estão contidos no item 2.1.

Doença periodontal e associações a doenças sistêmicas, micro-organismos relacionados, prematuridade, relação da doença periodontal e prematuridade e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real complementam a estruturação desta revisão, singularizada pela justificativa apresentada.

2.1 Publicações sobre a temática

O estudo bibliográfico proposto, foi inicialmente estruturado em quatro fases que compõem o item 2.1 (Publicações sobre a temática):

1] Investigação na base PubMed de artigos na língua inglesa relacionados ao termo “doença periodontal”, onde verificou-se 8.258 publicações que abordam o tema entre os anos de 2010 a 2012. Procurou-se apurar aqui a origem destas publicações, buscando classificá-las mundialmente, em sete continentes. Consequentemente, detectou-se o grande interesse de estudos desta natureza na Europa, com 2.843 estudos, seguidos numericamente pela Ásia com 2.381 publicações, 1.331 na América do Norte, Central e Caribe, 996 na América do Sul, 155 na África e 147 na Oceania (Quadro 1; Figura 1).

Quadro 1 - Número de artigos da base PubMed relacionados à doença periodontal, publicados entre 2010-2013, por continente.

	2010*	2011*	2012*	TOTAL
 AMÉRICA DO NORTE	206	580	545	1331
 AMÉRICA DO SUL	369	311	316	996
 ÁFRICA	56	44	55	155
 EUROPA	962	965	916	2843
 OCEANIA	60	39	48	147
 ASIA	748	666	967	2381
 ANTARCTICA	0	0	0	0
NÃO IDENTIFICADO	120	131	154	405
Total	2521	2736	3001	8258

*valores extraídos do banco de dados PubMed atualizados até a data de 16/01/2013 às 16:43 hs



Figura 1 - Distribuição do número de artigos relacionados na base PubMed a doença periodontal, por continente, entre os anos 2010 a 2012.

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

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

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

3] Em uma terceira fase, foram apontados, dentre os micro-organismos amplamente associados, os relacionados com artigos em ascendência e de grande interesse da comunidade científica: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*, foram então selecionados como os periodontopatógenos de eleição para esta tese;

4] A última fase consistiu-se na classificação dos artigos selecionados com a temática gravidez e pré termo, invocando o envolvimento destes à doença periodontal. Nova organização foi debatida, originando-se uma busca guiada, em uma disposição de síntese (Figura 2), com os seguintes descritores: “*Periodontal disease, periodontal disease and Aggregatibacter actinomycetemcomitans, periodontal disease and Porphyromonas gingivalis, periodontal disease and pregnancy, periodontal disease and preterm*”.

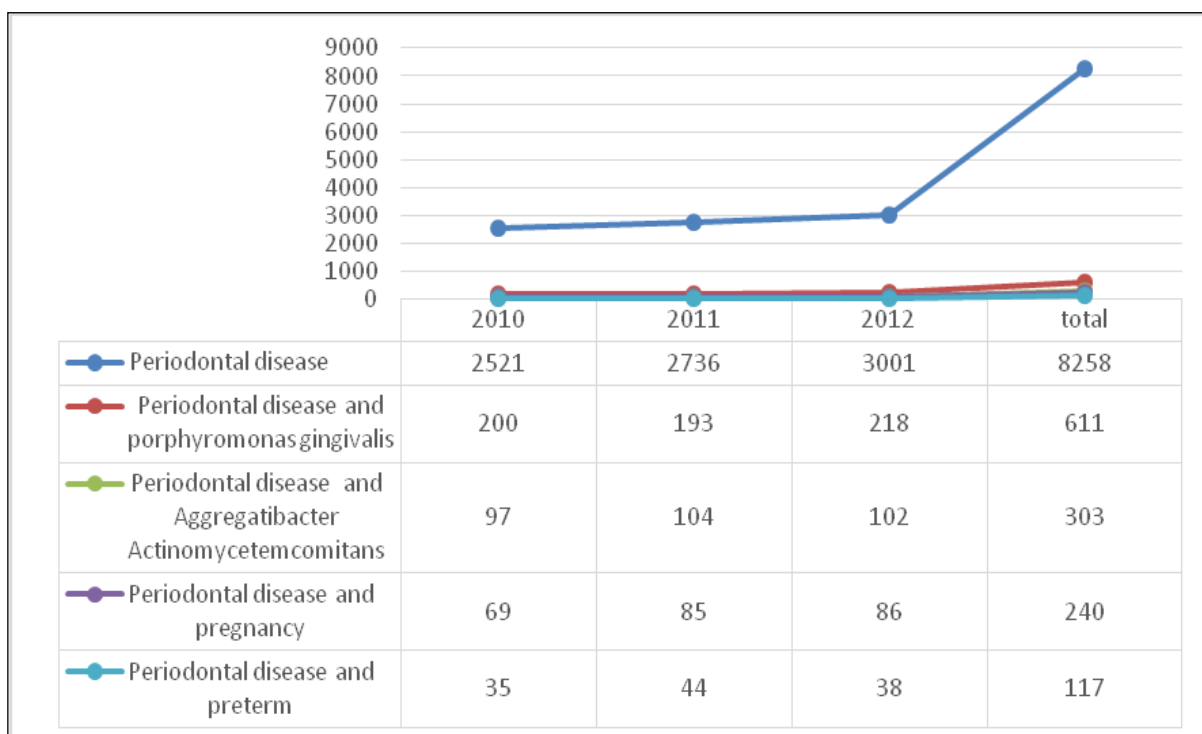


Figura 2 - Número de artigos da base PubMed de 2010 a 2012, relacionando doença periodontal e micro-organismos (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*), gravidez e prematuridade.

Na América do Sul, onde estão inclusos os artigos brasileiros (Quadro 1, Figura 1), neste período 996 artigos foram detectados, o que denota que a produção científica sobre a temática doença periodontal tem sido realizada, porém quando refina-se a busca e mundialmente comparamos a associação doença periodontal e gravidez (*periodontal disease and pregnancy*) e doença periodontal e parto pré termo (*periodontal disease and preterm*) o número de artigos, diminui consideravelmente, 240 e 117, respectivamente.

Desta forma, o tema encontra questionamentos que suscitam ainda grande interesse, principalmente devido às associações propostas.

2.2 Doença periodontal e associações à doenças sistêmicas

O arrolamento entre condições sistêmicas e a cavidade bucal não surgiu recentemente, desde 1890, a Medicina e a Odontologia marcaram a sua história neste sentido, em um período denominado a era da infecção focal. Há forte referência a Robert Koch, que ponderou sobre a cavidade bucal, como possível foco de infecção para determinadas doenças do organismo (MACHIARELLI; PIO, 2008).

Hunter (1910) também buscava explicações para as doenças de seus pacientes, e sugeriu a relação de condições bucais à condições sistêmicas. Na registrada conferência em Montreal, na Faculdade de Medicina da Universidade de McGill, este associa queixas obscuras do paciente com o desaparecimento das mesmas, quando houve a retirada de próteses dentais.

Billings (1914) *apud* Machiavelli e Pio (2008) reafirma esta corrente, sinalizando que a doença sistêmica surge quando ocorre disseminação de bactérias dos locais de infecção focal, como dentes e tonsilas, para órgãos distantes, via hematogênica e linfática. Assim, a infecção na cavidade bucal como causa de septicemia, artrite, endocardite, osteomielite e outras, foi ventilada e o tratamento baseava-se na remoção do elemento dental (exodontia). Mais tarde, houve a descrição que a remoção dos focos de dente não seriam necessárias para tratamento ou prevenção de doenças, sugerindo que a Odontologia e a Medicina deveriam rever os conceitos de infecção focal como causa de doenças sistêmicas.

Na década de 80, estudo com pacientes com doenças cardíacas foram realizados buscando associação com doenças na cavidade bucal, como gengivite, periodontite e infecção. Em pesquisa de acompanhamento, feitas por Destefano (1993), os resultados indicaram que a doença periodontal era um fator de risco para a doença cardiosvascular, com uma relação estatisticamente significativa.

Outros estudos neste sentido têm sido propostos e muitos sugerem que a doença periodontal também consistiria em um fator associado à prematuridade e baixo peso ao nascimento. Como uma infecção crônica, esta patologia poderia, em tese, influenciar o processo por dois mecanismos: indiretamente, onde os tecidos periodontais inflamados passariam a atuar como um reservatório de bactérias, as quais se translocariam via corrente sanguínea até a cavidade uterina; e diretamente, onde os próprios sítios periodontais produziriam mediadores inflamatórios e estes passariam a atuar como potenciais fontes de citocinas fetotóxicas (OFFENBACHER *et al.*, 1996; DASANAYAKE, 1998; MICHELL-LEWIS *et al.*, 2000; JEFFCOAT *et al.*, 2001; GLESSE *et al.*, 2004; ZANATTA *et al.*, 2007; VOGT *et al.*, 2010; KONOPKA; PARADOWSKA-STOLARTZ, 2012).

A doença periodontal, é a segunda doença bucal de maior prevalência no mundo (SILVA, 2008). De natureza infecciosa, relacionada com bactérias gram negativas. Estas tem um papel fundamental, pois estão ligadas a formação do biofilme dental, determinado como uma comunidade microbiana indefinida associada a superfície do dente, ou a qualquer outro material duro não-descamativo (WILDERER; CHARAKLIS, 1989), considerando que seu acúmulo resulta de uma resposta imune e inflamatória no tecido gengival subjacente do

hospedeiro à presença de bactérias e seus produtos (OFFENBACHER *et al.*, 1996). Estas respostas são mediadas por fatores locais, sistêmicos e genéticos (GRIGORIADOU *et al.*, 2010; STANDAR *et al.*, 2010).

É importante considerar que a maioria das doenças periodontais tem semelhança nas características clínicas, entretanto apresentam diferenças quanto à bacteriologia e até ao comportamento do indivíduo (principalmente em relação ao hábito de higiene bucal). Assim baseado nestas e em outras diferenças é que a classificação das doenças periodontais atualmente está ampliada e inclui as: doenças gengivais, periodontite crônica (PC), periodontite agressiva e periodontite associada a manifestações sistêmicas, entre outras (GESSER; PERES; MARCENES, 2001; DIAS *et al.*, 2006).

A periodontite crônica, segundo Ofenbacher (2004) é uma forma de infecção bucal que resulta na destruição dos tecidos que sustentam os dentes - ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar. Após a destruição dos tecidos de sustentação, o epitélio de inserção migra em direção ao ápice radicular formando as bolsas periodontais. As bactérias anaeróbias encontram nas bolsas periodontais um habitat ideal para se desenvolverem.

Cerca de 500 espécies estão distribuídas na cavidade bucal e apresentam-se isoladas ou associadas compondo o biofilme dental, porém somente um número reduzido está ligado à doença periodontal (ZANBON, 1996; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1997).

O processo da doença inicia-se com o desequilíbrio entre os micro-organismos e a defesa do hospedeiro, levando a alterações vasculares e formação de exsudato inflamatório. Esta fase é caracterizada clinicamente por alteração da cor da gengiva, hemorragia e edema, definida como gengivite. Em caso de progressão da doença, a estrutura fragilizada favorece o acesso dos agentes agressores e/ou seus produtos, podendo culminar com a formação de bolsas periodontais, e consequente perda óssea e reflexos no epitélio, ocasionando uma migração apical deste (LOURO *et al.*, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2006).

Embora tenham sido relatadas muitas espécies de bactérias nas bolsas periodontais, há uma complexidade que envolvem a etiologia e a progressão da doença e apenas algumas destas são periodontopatógenos, considerando também que muitas espécies também estão presentes em indivíduos saudáveis periodontalmente. Haffajee e Socransky (1994) sinalizaram espécies consideradas periodontopatógenos: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*. Estas bactérias indicadas seriam capazes de produzir toxinas, agredirem o tecido periodontal, com consequente resposta do sistema imunológico, promovendo destruição periodontal (TAKEUCHI *et al.*, 2001).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, *Porphyromonas gingivalis* e outras bactérias do periodonto são únicos para a cavidade oral, tendo em vista que podem disseminar para outros locais do corpo reforçando a tese da infecção focal de origem bucal (SLOTS; KAMMA, 2001).

Com intuito de esclarecer a patogênese dos processos infecciosos Socransky *et al.* (1998) descreveram seis complexos microbianos que instalam no biofilme sub-gengival de indivíduos adultos. Os complexos propostos são determinados por cores, o amarelo, azul, verde e violeta são constituídos por grupamentos de bactérias que tem capacidade de aderir a superfície dental, constituindo a base da pirâmide do biofilme e são os colonizadores iniciais da superfície dental e não se relacionam com a doença periodontal, e muito deles são considerados benéficos. A explicação dos autores reside no fato de que estes complexos basais fornecem receptores e criam condições ecológicas para implantação das bactérias do dois outros complexos (laranja e vermelho), implicados com a patogênese da doença periodontal. O complexo laranja precede e cria condições para o complexo vermelho, que é formado pela *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, consensuadas como agentes etiológicos da doença periodontal, e relacionadas a perda de inserção e sangramento a sondagem.

Considerando que neste estudo há claro interesse em pesquisar a relação doença periodontal e prematuridade, onde autenticados pela literatura pesquisada no tópico anterior que compõe a estruturação desta tese (2.1), esta relação tem sido evidenciada, o tópico 2.3 discorre sobre a temática, A seguir o tópico 2.4 aborda os micro-organismos incluídos como alvo desta pesquisa.

2.3 Relação doença periodontal e prematuridade

Caracteriza-se como parto prematuro o nascimento do bebê antes de 37 semanas e o baixo peso de nascimento, aquele recém-nascido que tem menos de 2.500 g, independente da idade da gestação (WHO, 1980).

Mundialmente, a prematuridade traduz-se como um evento de forte impacto na saúde pública. Dados atuais da Organização das Nações Unidas, revelaram 15 milhões de registros (WHO, 2012). Há uma tendência ascendente em muitos países, até se considerarmos os com status de países desenvolvidos, como os Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália (LAWN *et al.*, 2010). O Brasil está na décima posição entre os países onde nascem mais bebês prematuros.

Dados do Ministério da Saúde, no Brasil, entre 2000 a 2010, pelo SINASC-Sistema de Informação sobre Nascidos Vivos, apontava para um aumento da taxa de 6,8% para 7,2% , porém esta tendência vem sendo sinalizada desde a década de 1990 (SILVEIRA *et al.*, 2008).

Estudos recentes averiguaram esta prevalência, considerando dados de base primária e os resultados indicaram que estes estão subestimados, o que torna o quadro mais dramático e consideram que houve aumento deste percentual nas últimas décadas, colocando o país no mesmo patamar dos países de baixa renda (SILVEIRA *et al.*, 2013), com prevalência de 11,7%, observando os percentuais de 11,8% e 9,4% para países de baixa e média renda, respectivamente (WHO, 2012).

Os dados são de potencial importância, considerando que a prematuridade constitui-se como principal causa de morbidade e mortalidade neonatal, e responsável por 75% das mortes neonatais, sendo a causa mais frequente de morbidade neonatal, relacionada aos distúrbios respiratórios, complicações infecciosas e neurológicas. A redução da prematuridade tem se constituído um dos principais objetivos da Obstetrícia (FONSECA *et al.*, 1999; RADES *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2008).

Atualmente, esta alta prevalência de nascimentos prematuros tem consistido em inquietação face às complicações trazidas, além de apresentar repercussões sociais, econômicas e financeiras, esta última de grande influência, pois interfere diretamente no custo de internações, leitos de unidade de terapia intensiva, medicamentos, entre outros (SILVEIRA *et al.*, 2013).

Múltiplos fatores de risco são conferidos ao parto prematuro e/ou baixo peso ao nascer (GRANVILLE-GARCIA *et al.*, 2012). Dentre estes, foram constatadas fortes evidências que ligam a doença periodontal a condições sistêmicas (INABA; AMANO, 2010), e quando estas ocorrem com mulheres em período gestacional pode ser reconhecida como um fator de risco para a prematuridade e baixo peso ao nascer (GONZALES-MARIN *et al.*, 2011, SHANTHI *et al.*, 2012).

As variáveis tipo de gravidez, número de consultas pré natal, escore de apgar no 1º ao 5º minuto e o baixo peso foram associados a ocorrência de prematuridade (MELO; CARVALHO, 2014).

Spallicci *et al.* (2000) também abordando variáveis maternas, indicaram a hipertensão arterial, o antecedente de prematuridade, a rotura prematura da membrana e o número de consultas pré-natal como significativas para o parto prematuro. O tabagismo, etilismo, pré-natal incompleto, violência física e psicológica também foram sinalizados (VASCONCELOS *et al.*, 2012).

Porém, dados epidemiológicos apontam que 30 a 50% dos casos de prematuridade são desencadeados por infecção à distância (BITTAR; ZUGAIB, 1993; PASSINI JUNIOR; NOMURA; POLITANO, 2007), dentre estas infecções sistêmicas agudas estão a rubéola, encefalite, pneumonia e infecção do trato genitourinário, que teriam a capacidade de alcançar a unidade fetoplacentária, ocasionando alterações importantes como hemorragia focal que leva a pobre perfusão fetal, necrose e restrição do nascimento (ZANATTA *et al.*, 2007).

Nesta conjuntura, a prematuridade e o baixo peso ao nascer são eventos considerados de extrema importância para a saúde da mãe e da criança, portanto, reforça a questão da busca dos fatores de risco (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Collins *et al.* (1994) em experimento com animais, analisou os efeitos dos lipossacarídeos sobre a gravidez em hamsters, com dois micro-organismos, entre estes, a *Porphyromonas gingivalis*. Concluíram que a exposição materna a estas bactérias (aos lipossacarídeos) poderia induzir efeitos deletérios sobre o desenvolvimento do feto. Nesta linha, os autores citados publicaram nova pesquisa, que tinham como foco a avaliação dos mediadores inflamatórios, e depararam com um aumento acentuado de prostaglandinas (PGE2) e fator de necrose tumoral alfa (FNT - α), e peso menor para os animais do estudo.

Offenbacher *et al.* (1996) apresentou um estudo de grande repercussão para esta temática, apontando a doença periodontal como de forte associação com resultados adversos na gravidez. Mulheres grávidas foram examinadas após o parto e foi encontrada associação significativa entre periodontite e mulheres que tiveram bebês prematuros e baixo peso ao nascer, resultado diferente daquelas que tiveram filho a termo. A hipótese de patógenos advindo do periodonto e característicos da doença periodontal (anaeróbios e gram negativos) e a associação com endotoxinas e mediadores inflamatórios maternos poderiam estar relacionados a este evento.

Para Vettore (2006) estes resultados geraram interesse pois apresentaram um importante odds ratio de 7,9 para as mulheres grávidas com doença periodontal e prematuridade e baixo peso ao nascer.

Moimaz *et al.* (2009) afirmaram que há um risco temporário aumentado para mulheres gestantes quanto ao desenvolvimento de complicações periodontais, quadros de gengivite e periodontite são frequentemente encontrados. Na gravidez há um aumento dos níveis hormonais, de estrogênio e progesterona, principalmente deste último, resultando mudanças na permeabilidade vascular, clinicamente com possível edema gengival e aumento do fluido crevicular. A produção de prostaglandina também pode ser estimulada,

possibilitando o processo inflamatório gengival. A prevalência da doença periodontal na gravidez baseada em observações clínicas varia de 35 a 100%.

Basavaraju; Durga; Vanitha (2012) avaliaram a flora microbiana oral anaeróbia em mulheres grávidas antes e após o parto, comparando-as com o grupo controle. Detectaram as seguintes bactérias anaeróbias em mulheres grávidas: *Prevotella intermedia*, *Tanerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*. No grupo controle e após o parto observaram também os micro-organismos *Vielonella* e *Peptoestreptococcus*. A gravidez tem efeitos significativos no tecido peridontal, e a presença de hormônios, principalmente a progesterona, influencia às reações locais, potencializando alterações como o sangramento gengival e consequente gengivite.

Frequentemente os relatos de gengivite estão relacionados às alterações do periodonto na gravidez (YALCIN *et al.*, 2002).

Por sua vez, Dasanayake (1998) concluiu que condição periodontal insatisfatória é fator de risco para RNB. Embasou-se na avaliação do efeito da saúde bucal inadequada das gestantes no momento do parto sobre o peso do RN e verificou que mães com RNB ganharam menos peso durante a gestação e apresentaram menos áreas saudáveis de gengiva e mais áreas com sangramento gengival e cálculo dentário.

Na gestação, sugere-se que o comprometimento periodontal pode ser potencializado por alterações hormonais, como já descritas acima, mas outros fatores, como as deficiências nutricionais, estado transitório de imunodepressão, e as condições locais de higiene concorrem também para a exacerbação das condições (ROSELL *et al.*, 1999; AMAR, CHUNG, 2000; HONKALA; AL-ANSARI, 2005).

Offenbacher *et al.* (1998) expressaram que a infecção periodontal causada por bactéria anaeróbia gram-negativa poderia servir como um contínuo reservatório para translocação hemática do micro-organismo, que chegaria até a placenta. Por meio dos lipopolissacarídeos decorrentes da infecção periodontal haveria o desencadeamento da síntese de PGE2 e TNF- α pelas células corioamnióticas e posterior indução do parto pré termo, e a agressão imunológica induzida por micro-organismos periodontais, por meio dos mediadores inflamatórios produzidos localmente nos tecidos inflamados, devido a alta vascularização, poderiam entrar na corrente sanguínea atuando como fonte sistêmica de citocinas fetotóxicas (DANTAS *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2006; ZANATTA *et al.*, 2007; MACHIAVELLI; PIO, 2008; SERT *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2013).

A doença periodontal, de natureza similar às infecções geniturinárias, caracteriza-se pela proliferação de microorganismos gram-negativos dos tecidos periodontais. Mediadores

inflamatórios que ocorrem nas doenças periodontais, como a IL-1, TNF- α e as PGs, também possuem uma participação importante na iniciação do trabalho de parto, sendo considerados mecanismos biologicamente plausíveis que podem ligar as duas condições (ARAÚJO *et al.*, 2005).

A problemática referente ao processo fisiológico que desencadeia o trabalho de parto deve ser considerada e é objeto de intensas discussões, uma vez que não está definida a causa primária do seu determinismo. No parto normal, a ruptura da membrana ocorre após o início das contrações uterinas, induzidas por mediadores inflamatórios como as prostaglandinas (PGE); no início do trabalho de parto são encontradas concentrações aumentadas da PGE2 no líquido amniótico; sendo que uma das teorias mais bem delineadas para explicar o determinismo do parto é a teoria Prostaglandínica (DAVENPORT *et al.*, 2002).

Um dos mecanismos desta plausibilidade consiste no entendimento de que os micro-organismos que causam a doença periodontal, principalmente aqueles anaeróbios gram-negativos, concorrerem como fator de risco para partos prematuros e baixo peso ao nascer, e a associação de espécimes bacterianas, potencializam o risco (ÁFRICA; KAYITENKORE; BAYINGANA, 2010).

Na Índia, Chakki *et al.* (2012) correlacionaram o baixo peso do bebê no nascimento com a idade da mãe (IM), índice de placa (IP) e índice periodontal comunitário (CPI). Concluíram que a periodontite foi significativamente associada ($p < 0,0005$), com a redução de peso de nascimento.

Em relação às características dos micro-organismos envolvidos, Li *et al.* (2011) que investigavam mecanismos de associação destes com o BPN, estudaram especificamente o lipopolissacarídeo (LPS) produzido pelo *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, e este teve a capacidade de induzir a apoptose em trofoblastos humanos pela via mitocôndria-dependente e concluíram que esta implicação poderia contribuir para a patogênese da periodontite associada ao baixo peso ao nascer.

Todavia, estudos envolvendo populações específicas, como os realizados na Malásia por Ali e Abidin (2012), não atestaram a periodontite como fator de risco para pré-termo e baixo peso ao nascer, utilizando-se a determinação de índices periodontais.

Vogt *et al.* (2010), em estudos no Brasil, propuseram a avaliação da doença periodontal e a associação com resultados perinatais adversos, por meio de um estudo de coorte que acompanhou 327 gestantes de baixo risco, divididas em grupos com e sem doença periodontal. Foram utilizados índices de placa e sangramento gengival à sondagem, profundidade clínica de sondagem, nível clínico de inserção e retração gengival (exame

periodontal abaixo de 32 semanas de gestação). As taxas de nascimento prematuro (PTB), baixo peso ao nascer (BPN), pequenos para a idade gestacional (PIG) recém-nascidos e ruptura de membranas (RPM) foram avaliados utilizando-se Índices de Risco (IC 95%) e frações de risco atribuível à população. Constatou-se que a doença periodontal foi um fator de risco para a PT, BPN e PROM (ruptura previa da membrana) entre as brasileiras gestantes de baixo risco.

Muitos trabalhos para debater esta relação doença periodontal e prematuridade, tem trabalhado a detecção dos micro-organismos na placenta e/ou em seus anexos, para tanto considera-se que a placenta representa uma íntima união parabiótica dos tecidos materno e fetal, desenvolvendo uma complexidade de funções, entre estas, a homeostasia dos intercâmbios materno-fetais, produção de hormônios e integração dos requerimentos hormonais dos dois organismos. Nos casos de infecção, considera-se que a principal função do órgão é a de barreira física, que adia, mas não impede o trânsito de patógenos ao produto da concepção. Vias de infecção são descritas, sendo as mais debatidas, as vias ascendentes ou transmembranosa, onde a invasão dos micro-organismos dá-se pelo saco amniótico, roto ou íntegro e a via hematogênica, onde a invasão ocorre por meio do sangue materno, via circulação feto-placentária (GARCIA; AZOUBEL, 1986).

Para Garcia; Azoubel (1986) a presença de infiltrado inflamatório no cordão umbilical tem como evidência a exposição do feto a infecção intra-uterina ou mesmo acometimento infeccioso do feto. Estes eventos podem causar aborto, morte fetal e neonatal, doença neonatal, parto prematuro, malformações, doenças da infância e retardo de crescimento., requerendo métodos rápidos para diagnóstico.

A infecção bacteriana constitui-se em causa de morbidade e mortalidade neonatal.

O trabalho proposto por Miglioli (2003), propôs triagem de agentes etiológicos de possíveis septicemias congênicas no sangue do cordão umbilical e placenta, por meio de hemocultura e cultura de tecido placentário, em casos de gestação considerada de risco. Verificou que as taxas de identificação de sequências gênicas das bactérias por meio do PCR foram maiores na placenta, todavia concluiu que tanto no sangue, como na placenta a PCR foi menos sensível, porém muito mais específico.

Katz *et al.* (2009) testaram a hipótese de que patógenos periodontais poderiam estar presentes e afetarem a placenta humana em casos de corioamnionite. Utilizaram a imunocitoquímica e a partir desta identificaram a presença de antígenos de *Porphyromonas gingivalis* em tecidos placentários. Houve um aumento expressivo na intensidade de coloração imunológica de tecidos seccionados a partir de mulheres com corioamnionite em

comparação com aquelas que experimentaram uma gravidez normal . Sugeriram que este micro-organismo pode colonizar tecido placentário, e a presença do mesmo pode contribuir para o parto prematuro.

O objetivo do estudo de Ovalle *et al.* (2009) foi determinar a relação entre doença periodontal, infecção bacteriana e patologia placentária, com o nascimento prematuro. Observaram em seus resultados que a presença de doença periodontal e infecção bacteriana ascendente está associada ao parto prematuro. A idade média das mulheres pesquisadas foi de 26 anos (n=54), grávidas entre 24 e 34 semanas, com diagnóstico de trabalho de parto prematuro sem causa clínica óbvia. Os resultados apontaram prevalência da doença periodontal de 93,2%. Houve invasão do líquido amniótico pelas bactérias estudadas, entre elas a *Porphyromonas gingivalis*, em 27,1% das pacientes. A prevalência da infecção ascendente foi de 83,1% e em 72,9% das mulheres foi associada com doença periodontal. Em síntese, os autores do trabalho evidenciam a forte associação da doença periodontal generalizada com a prematuridade e a presença conjunta da doença periodontal e infecção bacteriana ascendente com o parto pré-termo.

Feitosa (2011), analisou a prevalência da doença periodontal e de periodontopatógenos (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Tannerella forsythia*) nos sítios relacionados com as vias ascendentes (boca para vagina e âmnio) e hematogênica (boca para parênquima placentário) da infecção de anexos fetais, visando a relação com corioamnionite e desfecho reprodutivo ruim. Observou elevada prevalência de doença periodontal, corioamnionite e de todos os desfechos reprodutivos ruins nas pacientes analisadas, todavia apenas a *Porphyromonas gingivalis* e a *Fusobacterium nucleatum* foi concomitantemente observadas em dois ou mais sítios, analisando também que as bactérias periodontais podem atingir o parênquima placentário, mas não foi permitido a associação com vilosidade.

Swati *et al.* (2012) procuraram também nesta linha de pesquisa, descobrir evidências isolando patógenos periodontais específicos em amostras orais e de tecido placentário utilizando material de mães hipertensas e normotensas em parto via cesariana. Dentre as bactérias estudadas estavam a *Porphyromonas gingivalis* e a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, os resultados levaram a observação de que a prevalência de periodontopatógenos foi mais evidenciada nos grupo hipertenso que no controle, ainda estes micro-organismos foram detectados em todas as amostras da placa sub-gengival e placenta estudadas, independentemente do status da doença periodontal. Nesta concepção, considera-

se que a colonização oral de bactérias gram-negativas anaeróbias tem sido apontada como um fator de risco para parto prematuro de bebês de baixo peso (ÁFRICA *et al.*, 2010).

Hasegawa-Nakamura *et al.* (2011), contextualizaram que a *Porphyromonas gingivalis* pode ser encontrada no líquido amniótico e na placenta de mulheres com doenças obstétricas, para tanto cultivaram células do córion estimuladas com o lipopolissacarídeo da *Porphyromonas gingivalis* verificando a expressão do gene que codifica o receptor (TLR-2)-Tool like receptor-2. PCR em tempo real foi utilizado para avaliar a expressão de mRNA dos genes TLR-2 e o Tool like receptor – 4 (TLR-4), nas células, sendo ainda medidos os níveis de interleucina-6 e interleucina-8 nos sobrenadantes de cultura, pelo método de ELISA. Como resultado obtiveram que a *Porphyromonas gingivalis* foi detectada em tecido coriônico de 06 mulheres (n=23), duas com ameaça de parto prematuro, duas com gravidez múltipla e duas com placenta prévia, constatando que o lipopolissacarídeo da *Porphyromonas gingivalis* induziu a produção das interleucinas, IL-6 e IL-8 via TLR-2 em células derivadas do córion.

Sert *et al.* (2011) objetivaram a avaliação dos níveis de soro de interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF)- α , fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), factor de crescimento placentário (PIGF), e receptor VEGF solúvel (sVEGFR) -1 e -2 na associação entre doença periodontal e resultados adversos da gravidez. Participaram mães que tiveram bebês a termo, pré termo, baixo peso ao nascer e mulheres não grávidas, relacionando as mães com idade gestacional e peso da criança. Houve coleta de sangue venoso para avaliação do soro (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , VEGF, PIGF, e sVEGFR-1 e -2 níveis). Verificaram que os níveis séricos de IL-1 β , VEGF, e sVEGFR-1 e -2 pode ter um efeito potencial sobre o mecanismo da associação entre doença periodontal e resultados adversos na gravidez.

Muitos estudos foram realizados neste sentido. Gonzales Marin *et al.* (2011) determinaram os níveis e proporção das bactérias periodontais em aspirado gástrico neonatal, provenientes de gravidez com alguma intercorrência importante. O trabalho também verificou se os micro-organismos poderiam ser encontrados em amostra oral e vaginal de mães, através de PCR e, conseqüentemente, detectaram a presença da *Porphyromonas. gingivalis* em amostras colhidas dos neonatos.

Haje *et al.* (2011), através de ensaio clínico com mulheres coreanas, objetivaram a confirmação das associações entre comportamentos de saúde bucal, periodontite e pré-eclampsia e concluíram que a pré-eclampsia poderia estar associada às condições materno-periodontal e limpeza interdental.

Ávila *et al.* (2011) estudaram a doença periodontal em mulheres grávidas com doença valvar reumática, relacionando-a a risco de endocardite infecciosa a maior taxa de nascimento prematuro e a baixo peso ao nascer. Realizaram o exame periodontal (por profundidade de sondagem, margem gengival, nível clínico de inserção, sangramento e índice de placa gengival) e da análise microbiológica realizada em amostras de soro e fluido gengival, considerados controles positivos para *Porphyromonas gingivalis*, *Agregatibacter actinomycetenumcomitans* e *Tanerella forsythia*. Metade destas mulheres apresentavam doença valvar reumática e metade era saudável (n=140). Os resultados entre elas foram compatíveis.

Takeuchi *et al.* (2013), em estudos que buscaram verificar se o grau de inflamação periodontal apresentava relação com o crescimento fetal (foi realizada avaliação do fêmur) com o peso ao nascer e o tempo de nascimento, após tratamento periodontal da mãe, concluíram que a profundidade de sondagem (PPD) e nível clínico de inserção (CAL) aumenta significativamente o risco de parto prematuro e/ou baixo peso ao nascer. No entanto, PPD e CAL nem sempre refletiam a inflamação do tecido periodontal atual. Consideraram ser apropriado o índice de sangramento na sondagem (BOP) como indicador de inflamação periodontal. Estes recrutaram 203 gestantes (idade média de $31,8 \pm 4,5$ anos), incluindo 20 pacientes com inflamação periodontal e 183 controles com periodonto saudável. Parâmetros de crescimento fetais, bem como condições periodontais foram registrados. A idade gestacional perinatal foi de $39,4 \pm 1,3$ semanas; 8 tiveram crianças pré-termo e 12 tiveram uma criança com baixo peso ao nascer. Os resultados da análise de regressão múltipla *stepwise* indicaram que o comprimento do nascimento apresentou correlação negativa com o BOP% ($\beta = -0,175$, $p = 0,002$). Os parâmetros de comprimento do fêmur ao nascimento do feto e o peso dentre as mães com inflamação periodontal baixa foram significativamente maiores do que daqueles dentre as mães com inflamação periodontal alta ($p < 0,05$). A taxa de BPN no grupo com inflamação periodontal elevada era significativamente maior do que no grupo de baixa inflamação periodontal ($p < 0,05$).

O tratamento da doença periodontal tem sido estudado como uma medida preventiva. Neste sentido, Polyzos *et al.* (2010) utilizou a técnica da raspagem e alisamento da raiz dos dentes afetados durante a gravidez, na tentativa de uma associação com redução de partos prematuros, porém o procedimento não foi considerado uma forma eficiente para esta redução. Corroborado por Rosa *et al.* (2012), que demonstraram que o tratamento periodontal de rotina durante a gravidez não pode ser considerado como eficaz na redução da incidência de parto prematuro e do baixo peso ao nascer.

Em um estudo de intervenção, Mitchell-Lewis *et al.* (2000) avaliaram o efeito do tratamento periodontal sobre o nascimento de RNBP. Analisaram 130 gestantes, em que 45 tiveram a condição periodontal observada durante a gravidez e receberam tratamento periodontal (raspagem subgengival, alisamento radicular e instrução de higiene bucal) e outras 85 gestantes que foram examinadas pós-parto, não recebendo tratamento periodontal anterior ao parto. A prevalência total de RNBP (<2.500g ou IG <37 semanas) foi 14,6% (19 casos). Os nascimentos prematuros com peso abaixo do normal ocorreram em 18,8% das gestantes que não receberam tratamento periodontal (16 casos), mas em apenas 6,7% (três casos) das gestantes que receberam terapia periodontal. Desta forma os autores concluíram que o tratamento periodontal em gestantes pode substancialmente reduzir o risco de PPT e RNBP.

Estudos envolvendo tratamentos não cirúrgicos no segundo trimestre da gestação foram propostos por Oliveira *et al.* (2012), mas estes não observaram redução de risco de parto prematuro ou de baixo peso ao nascer.

Porém, OLIVEIRA *et al.* (2010) em estudo de revisão de literatura por meio da busca de artigos da base Medline/Pub med, escritos em inglês, entre 1998 a 2009 constataram diferentes resultados e concluíram, que a maioria dos estudos em que foi empregado o tratamento não cirúrgico periodontal, este reduzia a incidência de bebês prematuros e com baixo peso.

Boutin *et al.* (2012), nesta mesma linha, por meio de estudos randomizados, com mulheres submetidas a tratamento periodontal, outras sem nenhum tipo de tratamento, em estimativas agrupadas, não observaram redução significativa de parto prematuro com o tratamento periodontal. Todavia, houve uma heterogeneidade considerável entre os estudos, que poderia ser explicada pelo risco de polarização, o nível de rendimento, ou pelo uso de bochechos de clorexidina como uma co-intervenção nesta pesquisa. Não obstante, o uso diário de bochechos de clorexidina foi associado com redução de parto prematuro e com a heterogeneidade moderada entre os cinco estudos incluídos. Alertaram que a clorexidina utilizada para bochechos como agente preventivos deve ainda ser objeto de mais avaliações.

Konopka e Paradowska-Stolarz (2012) em estudo na Polônia, realizaram uma meta-análise, correspondente a 15 estudos de caso-controle, 1 estudo prospectivo e 6 estudos de coorte sobre a influência da periodontite na prematuridade e baixo peso ao nascer. Estes ensaios, provenientes de 4 continentes (Europa= 8; América do Sul = 7; América do Norte = 4; Ásia = 3), envolveu 12.047 mulheres gestantes. O odds-ratio global que relacionava nascimento prematuro, baixo peso ao nascer para as mães com periodontite, no modelo de

efeitos aleatórios foi de 2,35 (1,88-2,93, $p<0,0001$). Para baixo peso ao nascer, foi de 1,5 (95% CI: 1,26 -1,79, $p=0,001$) e para partos prematuros foi -2,73 (95% CI: 2,06 -3,6, $p<0,0001$). Frente aos resultados, sugeriram novos estudos, considerando a hipótese da periodontite como fator independente de nascimento prematuro e baixo peso ao nascer.

2.4 Micro-organismos relacionados

2.4.1 *Porphyromonas gingivalis*

Trata-se de bactéria anaeróbia estrita, gram-negativa de primordial importância como patógeno periodontal, que se desenvolve quando há decréscimo da pressão de oxigênio, precedida pela ação de colonizadores primários. Caracterizam-se por possuir mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo, o que faz com que este micro-organismo sobreviva dentro das bolsas periodontais, mesmo quando exposto a condições aeróbicas. Pode ser encontrada em proporções reduzidas em indivíduos sem perda de inserção clínica, podendo ser reconhecida como parte da microbiota normal (MEURIC *et al.*, 2010; BOISVERT; DUNCAN, 2010)

A *Porphyromonas gingivalis* é um cocobacilo, reconhecido como um agente etiológico principal da doença periodontal, relacionado à periodontite crônica, exibindo uma variedade de fatores de virulência (GROEGER *et al.*, 2010), intimamente associados com formas generalizadas desta doença (SHAIK-DASTHAGIRISAHEB, 2010).

Está envolvida também nas infecções do canal radicular. A invasão de células não fagocíticas pela *Porphyromonas gingivalis* é um evento que pode ocorrer, sinalizando o caráter oportunista do micro-organismo, que pode multiplicar-se no citoplasma e permanecer dentro da célula, fato este que pode estar ligado à sustentação da cronicidade da lesão do periodonto e pode tornar mais difícil o seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro, o que pode levar à multiplicação e disseminação nos tecidos adjacentes (WANG *et al.*, 2010).

Apresenta fatores de virulência diversos, assim como outros micro-organismos, relacionados à sua aderência aos tecidos hospedeiros, proteção à resposta imune, bem como a mecanismos de destruição tecidual. Tais determinantes da virulência acontecem também devido a uma variedade de enzimas produzidas em seu metabolismo (BAINBRIDGE *et al.*, 2010). Tais enzimas são liberadas no meio onde o micro-organismo se instala, manejam as vias de sinalização celular, garantindo que o mesmo permaneça no meio intracelular.

Produz vários tipos de enzimas proteolíticas, incluindo *Arg-gingipain* (Rgp) e *lys-gingipain* (Kgp), collagenases, e uma Dipeptidyl aminopeptidase IV. Embora estas enzimas tenham funções fisiológicas para *Porphyromonas gingivalis*, elas têm sido sugeridas por desempenhar funções múltiplas no processo patogénico da periodontite. Com efeito, proteases da *Porphyromonas gingivalis* hidrolisam uma variedade de proteínas sorológicas e teciduais, contribuindo assim para neutralizar o sistema de defesa imune e podem causar a destruição dos tecidos (GRENIER ; LA, 2011).

O processo de internalização da *Porphyromonas gingivalis* em células epiteliais gengivais é mediado pelas fimbrias, na adesão e invasão, envolve a produção de *gingipainas* e uma gama de proteínas (SHOJI *et al.*, 2011; DASPHER *et al.*, 2012). Estas fimbrias são componentes filamentosos inseridos e distribuídos sobre a superfície celular da bactéria, que atuam na fixação do micro-organismo nas células do hospedeiro. O gene *FimA*, responsável pela codificação da fimbrilina (sub unidade proteica da fimbria), são classificados em seis genótipos (tipo I, tipo I b, tipo II, tipo III, tipo IV, tipo V) com base na sequência de nucleotídeos (WANG *et al.*, 2010).

Incluem nos fatores de virulência, a presença das lipoproteinases, e hemaglutinina, e alguns destes fatores estão associados com a formação de biofilme, no entanto, o mecanismo exato de formação deste é ainda desconhecido. A pigmentação das colônias de bactéria em placas de ágar sangue está relacionada com a sua virulência (YAMAGUCHI *et al.*, 2010).

A nutrição do patógeno é feita por canais especiais ou poros formados por porinas, que são proteínas. Apresenta ainda um lipopolissacarídeo na membrana, denominado LPS (ZARIC *et al.*, 2010), que confere propriedades antigénicas. O fator contribuidor em tornar a bactéria resistente, se deve exatamente pelas características da cápsula polissacarídica, que atua como um depósito de água e nutrientes.

Esta funciona também como uma barreira para o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. A capsula interfere para uma diminuição nos níveis de transcrição dos genes que codificam a interleucina - 1 β , interleucina-6 e interleucina -8 em fibroblastos, fato que contribui significativamente para enfraquecer a resposta do hospedeiro, permitindo a permanência do patógeno (BRUNNER *et al.*, 2010). A opsonização é afetada pela sua redução e ocorre a potencialização da resistência à fagocitose pelos leucócitos, permitindo a sobrevivência do micro-organismo.

Quanto aos processos biológicos, a apoptose constitui-se como fundamental para os organismos multicelulares para extinguir células infectadas, que permitirá ao organismo assegurar a homeostase. Foi demonstrado em estudos *in vitro* que a *Porphyromonas*

gingivalis tem potencial para induzir a apoptose de fibroblastos, linfócitos, células endoteliais e epiteliais da gengiva. Porém, dois comportamentos podem ocorrer, dependendo da quantidade de bactérias e o tempo de exposição, se o quantitativo de bactéria for baixo e tempo de exposição curto, ocorre invasão bacteriana e decorrente inibição da apoptose, porém se houver aumento de bactérias e maior tempo de exposição, a apoptose poderá ocorrer (STATHOPOLOU *et al.*, 2009).

Myzac *et al.* (2014), em estudo aprofundado sobre *Porphyromonas gingivalis* destaca que este periodontopatógeno tem a capacidade de aderir à célula hospedeira, internalizando-se pela membrana (*rafts* lipídicos), incorporando-se por intermédio dos primeiros fagossomos, ativando a autofagia celular para fornecimento de um ambiente favorável a replicação, enquanto suprime a apoptose. O vacúolo replicante contém as proteínas da célula hospedeira que foi adquirida por autofagia, contribuindo para o mecanismo de sobrevivência do patógeno.

Alguns estudos procuraram identificar possível relação com a patogênese de doenças sistêmicas. Recentes ensaios conduzidos por Rohner *et al.* (2010) envolveram a artrite reumatoide (AR) e relação do envolvimento da *P. gingivalis* com a apoptose. Os pacientes com AR exibiram frequentemente doença periodontal, que está associada com patógenos como a *Porphyromonas gingivalis*. Propuseram assim analisar os efeitos diretos de *Porphyromonas gingivalis* em apoptose de condrócitos humanos (uma característica de doenças inflamatórias articulares) para propor uma inter-relação da patogênese da AR com a infecção. Condrócitos primários foram infectados com *Porphyromonas gingivalis* e analisados utilizando anexina-V, 7AAD, e iodeto de propídio e examinados por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. A ativação de caspases e fragmentação de DNA foram determinadas por análise de *Western blot* e reação de tunel. Os dados apontaram que *Porphyromonas gingivalis* promove os estágios iniciais e posteriores da apoptose nos condrócitos humanos primários, o que pode contribuir para a lesão articular que ocorre na patogênese da artrite reumatóide.

Dentro do hospedeiro humano, a maioria do ferro é encontrada no interior das hemácias na forma de hemoglobina, proteínas do heme ou ferritina. Quantidades pequenas de ferro extracelular também são complexadas a proteínas ferro-ligantes, principalmente ferritina, que é achada no soro e lactoferrina presente dentro da superfície das mucosas. O nicho da *Porphyromonas gingivalis* está compreendido juntamente com outras espécies no sulco gengival, uma área que experimenta flutuações na temperatura, no pH, na osmolaridade e na disponibilidade de nutrientes. Elas podem invadir, se reproduzirem e persistirem a altas

densidades nas células epiteliais da gengiva. Há evidências de que o componente da saliva denominado LF-T Lactoferrim pode exibir atividade antimicrobiana contra formas planctônicas da *Porphyromonas gingivalis* em concentrações mais elevadas, inibindo também a formação do biofilme e reduzindo-o em condições fisiológicas *in vitro* e *in vivo* (WAKABAYASHI *et al.*, 2010).

Estudos conduzidos por Okada *et al.* (2010), utilizaram o beta-bloqueador propranolol no tratamento de perda óssea alveolar induzida pela infecção da *P. gingivalis*, com o objetivo de examinar o envolvimento dos nervos simpáticos na destruição periodontal, pelo entendimento de que a noradrenalina liberada a partir de terminais nervosos simpáticos liga-se a receptores específicos adrenérgicos em células imunes. O bloqueio dos beta-receptores no tecido periodontal, pelo uso do propranolol, inibiu a diferenciação dos osteoclastos e impediu a perda óssea alveolar induzida pela infecção por *Porphyromonas gingivalis*. Segundo os autores, estes resultados indicam que o sistema nervoso simpático está envolvido no desenvolvimento da periodontite e sugerem que a modulação do sinal simpático por beta-bloqueadores permite o controle do metabolismo do osso alveolar.

2.4.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é gram negativo, capnófilo, fermentador de carboidratos. Apresenta colônias diáfanos, e expõe estrutura interna em forma de estrela, que tem seu aspecto determinado quando da observação de emissão de pseudópodos, o que provavelmente confere o aspecto estrelado (GASPARETTO *et al.*, 2000), apresenta fimbrias na superfície que favorecem o mecanismo de adesão. Estudos o relacionam com casos de periodontite agressiva (GOULART *et al.*, 2010) e de periodontite crônica (ROMANTORRES *et al.*, 2010; CORTELLI JR. *et al.*, 2010). Este coloniza a cavidade oral como agente localizador e causador da periodontite agressiva de rápida progressão que afeta indivíduos jovens, aumenta a profundidade da bolsa periodontal, perda óssea alveolar e infecção do sítio periodontal (DOGAN *et al.*, 2008; KACHLANY, 2010). Pode estar presente em indivíduos clinicamente saudáveis no aspecto periodontal.

A leucotoxina procede das toxinas RTX - *repeats in toxin*, referindo-se às regiões C terminais das toxinas que são ricas em repetições de glicina e aspartato) que produzem a hemolisina e apenas alguns micro-organismo a possuem, dentre estes o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. As RTX possuem 116 KDa, codificadas em uma estrutura única, o operon *rtx* cromossômico, formado por quatro genes (*Ltxc*, *Ltxa*, *Ltxb* e *Ltxd*), e tem a

propriedade de causar citotoxicidade em neutrófilos e macrófagos. Existe um comportamento diferenciado dos genes, destes, o *LtxA* tem influência capital na atividade citolítica da leucotoxina, observando que existem cepas que produzem quantidade superior de toxina do que aquelas cepas consideradas menos leucotóxicas. Os outros genes também assumem papéis que operacionalizam a ação do micro-organismo, enquanto o gene *Ltxc* é responsável por codificar uma proteína capaz de ativar a leucotoxina produzida pelo gene *Ltxa*, os genes *Ltxb* e *Ltxd* codificam peptídeos que participam do transporte do produto para a superfície celular bacteriana. A sua secreção ocorre após o reconhecimento de uma sequência sinal localizada no C-terminal da proteína (KACHLANY, 2010; JOHANSSON, 2011).

Roman-Torres *et al.* (2010) observaram que há uma significativa perda de inserção periodontal em pacientes com alta produção de leucotoxina, quando comparados a pacientes com uma pequena variedade leucotóxica ou pacientes que não foram infectados, levando ao entendimento de que a produção da leucotoxina pelo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* seja um mecanismo usado pela bactéria para desviar uma resposta imune do hospedeiro.

Recentemente, a toxina distensora citoletal – CDT - *Cytolethal distending toxin* foi descoberta. A CDT afeta vários tipos de células, inibindo a proliferação e induzindo a morte celular. Age por meio da modificação morfológica nas células alvo, podendo inibir o crescimento das células epiteliais, endoteliais e fibroblásticas, bem como linfócitos T e B, prejudicando irremediavelmente a resposta do hospedeiro. Tanto a RTX como a CDT não são produzidas por outras espécies de bactérias conhecidas que colonizam a cavidade oral. A CDT codificada pelo operon *cdt* em *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* constitui-se na única toxina bacteriana assinalada, capaz de levar o DNA das células alvo a um dano imediato (MAYER *et al.*, 1999; ANDO *et al.*, 2010).

O *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* apresenta antígenos de superfície determinantes dos diversos sorotipos que caracterizarão cada espécie, variando de A a F, estando relacionados com a patogenicidade. Constata-se assim uma heterogeneidade clonal na virulência entre as diversas cepas, levando à observação de que um indivíduo com um sorotipo de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, venha ser colonizado por diferentes genótipos bacterianos, o que pode ocasionar modificações decorrentes da desagregação colonial. Podendo ocorrer no processo de captação e incorporação genômica de fragmentos de DNA extracelular, por transformação bacteriana, o aparecimento de linhagens clonais genotipicamente diferentes, influenciando sobremaneira o status da virulência. Consequentemente, o aparecimento dos clones estrutura a população de *A. actinomycetemcomitans* com sorotipos diferentes A, B e C. Dentre os sorotipos mais

expressivos está o sorotipo B, denominado JP2, altamente leucotóxico, caracterizado por uma deleção no par de bases de posição 530, que é responsável pelo gene da regulação da produção e expressão da leucotoxina. Pacientes portadores do clone desta tipagem apresentam estágios mais avançados da doença. Este é particularmente isolado em populações africanas (ROMAN-TORRES *et al.*, 2010).

Em estudos com caucasianos, Claesson *et al.* (2011) constataram que o JP2 pode estar presente nesta população. Sua presença foi detectada em indivíduos mais velhos. Por outro lado, Sakellari *et al.* (2011), investigaram a distribuição destes sorotipos do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e prevalências em amostras subgengivais de indivíduos gregos, mas não foi detectado o JP2 nesta população.

Estudos avaliando a presença e função dos anticorpos sistêmicos, para a leucotoxina, produzida pelo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foram realizados na Suécia, em indivíduos de meia idade, com fatores médicos relacionados a doenças cardiovasculares. Amostras de soro foram examinadas contra anticorpos para leucotoxina, através de western blot. Investigou-se também a capacidade de neutralização da leucotoxicidade em ensaio de atividade leucotoxina e cultura de células leucêmicas. Os resultados mostraram uma alta prevalência de anticorpos contra a leucotoxina produzida pelo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na população analisada. Estes anticorpos foram correlacionados com a capacidade de neutralização da leucotoxina, bem como com os títulos de ELISA de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* específico IgA e IgG. Além disso, níveis elevados de anticorpos para leucotoxina foram correlacionados com o aumento da idade, mas não com parâmetros de doença periodontal ou fatores de risco cardiovasculares. Concluiu-se que os anticorpos sistêmicos anti-leucotoxina do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, eram comuns nesta população adulta sueca. Estes anticorpos podem contribuir para limitar os efeitos sistêmicos da infecção (BRAGE; HOLMLUND, JOHANSSON, 2010).

Raslan *et al.* (2011) abordaram o conhecimento das inter-relações bacterianas e sua associação com a condição clínica periodontal, em relação a manobra terapêutica. Avaliaram a distribuição de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em relação a duas espécies bacterianas membros dos complexos Vermelho e Laranja, bem como a relação entre a combinação de cepas leucotóxicas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* com o aparecimento clínica da doença. Concluíram que indivíduos com periodontite agressiva exibiram maiores frequências de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, e ainda que a presença de *Porphyromonas gingivalis* e/ou *Prevotella intermedia* não potencializou a patogenicidade das

cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade, pois tal combinação foi somente acompanhada de maior inflamação.

As bacteremias ocorrem geralmente em condições onde a doença periodontal está presente e podem estar associadas a doenças sistêmicas (MC NICOL; ISRAELS, 2010). Entre estas, temos as endocardites infecciosas. Wang *et al.* (2010), descreveram o curso clínico e a evolução de pacientes com infecção invasiva pelo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em um período de 19 anos (1985-2004) e onze pacientes apresentaram complicações significativas. Observaram que as lesões da cavidade oral foram os prováveis portais de entrada, e nestes incluem-se dentes com cárie, periodontite ou radioterapia de campo orelha, nariz e garganta.

2.5 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

Segundo Nascimento *et al.* (2010), a reação em cadeia de polimerase por tempo real, considerando os últimos anos, configurou-se como uma técnica de bastante uso na investigação biológica, principalmente pela capacidade de amplificação e detecção simultâneas de quantidades muito pequenas de sequências específicas dentro de uma mistura complexa de DNA.

Para Simonato *et al.* (2007) que comparou dois métodos utilizados para obtenção do DNA a partir de material parafinado, as técnicas de otimização para extração de DNA e posterior utilização na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) proporcionam a investigação diagnóstica, mesmo quando o DNA está presente em pequenas quantidades, considerando, entretanto, que devem ser analisados de forma adequada. Resquícios de saliva, esfregaços bucais, sangue, bulbos capilares, tecidos incluídos em parafina, ossos, gotas de esperma são utilizados e podem fornecer informações importantes quando da utilização dos métodos.

Comparação entre cultura bacteriana e PCR em tempo real para teste diagnóstico para patógenos periodontais foi abordada por BEDRAN *et al.* (2010), contextualizando que a metodologia da PCR envolve a técnica de PCR convencional e PCR em tempo real, esta última acompanha o aumento do produto do PCR por meio de amostras enzimáticas, possibilitando a detecção de um número muito pequeno de patógenos, apresentando uma maior especificidade e sensibilidade, nos quais não estão no limite da detecção da cultura bacteriana, observando ainda que tem sido utilizada para identificar patógenos periodontais,

entre eles, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*.

Para Miglioli (2009) existem poucos trabalhos fazendo uso da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real, na busca de amplicons de agentes bacterianos, afirmação esta em estudo que utiliza a técnica usando material colhido do aspirado gástrico e traqueal de recém nascidos. Sugere que os hospitais devam ter laboratório de biologia molecular para desenvolvimento de técnicas que propiciem o diagnóstico preciso e precoce de agentes infecciosos.

2.6 Justificativa

É fato que a doença periodontal ainda traduz-se como um dos principais problemas de saúde bucal nos continentes, principalmente em países onde a promoção e a prevenção ainda não foram completamente incorporadas como medida de caráter coletivo e individual.

A pluralidade dos fatores que a determinam caracterizam a complexidade, envolvendo uma microbiota variada, com micro-organismo distintos quanto aos fatores de virulência. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* pertencem à microflora e ambos estão relacionados com a doença periodontal em diferentes estágios, apresentando características que os colocam no interesse médico-científico direto, considerando-se as toxinas produzidas, bem como as leucotoxinas do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e as enzimas proteolíticas do *Porphyromonas gingivalis*. Estes, em situações específicas apresentam-se como patógenos de envolvimento sistêmico ligados à gravidez e à prematuridade.

No Brasil, o nascimento prematuro é um problema configurado e a análise dos fatores de risco tem sido apontada pelos pesquisadores como prioritária, potencializada pelo fato de que nestes fatores de risco estão envolvidas as gestantes classificadas em um primeiro momento como de baixo risco.. Uma das alternativas relacionadas a medidas preventivas e de operacionalidade na prática seria o tratamento preventivo odontológico em todas as mulheres grávidas. Alguns estudos já trazem esta afirmação constatando que há redução dos bebês prematuros e baixo peso ao nascer . Todavia, não há referências conclusivas sobre a relação que determina a ocorrência de partos prematuros por esta causa específica, ou como também sobre benefícios diretos em relação ao tratamento preventivo periodontal como fator profilático da prematuridade. Portanto, sugere-se no presente trabalho a intensificação do

desenvolvimento de mais pesquisas e estudos de referência, considerando-se o estouro da produção bibliográfica mundial atual neste sentido.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar as relações de prematuridade e doença periodontal através da detecção de DNA genômico de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em biofilme bucal materno e tecido placentário.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Desenhar oligonucleotídeos iniciadores para a detecção de *Porphyromonas gingivalis* através de PCR em tempo real (PCRtr).
- b) Desenhar oligonucleotídeos iniciadores para a detecção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* através de PCRtr.
- c) Desenvolver uma PCRtr para amplificação de fragmentos alvos dos genomas de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em biofilme de exsudato de sulco gengival materno, tecido placentário e sangue de cordão umbilical.
- d) Desenvolver uma RT-PCRtr para o estudo da expressão dos mRNAs que codificam a RNA polimerase do *Porphyromonas gingivalis* e a leucotoxina do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a partir de RNA total de tecido placentário.
- e) Avaliar amostras de tecido placentário positivas para PCRtr através de microscopia confocal.
- f) Comparar os resultados obtidos das diferentes metodologias aplicadas nos espécimes avaliados, relacionando a prematuridade com a doença periodontal.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Gestantes

Foram incluídas neste estudo mulheres que tiveram parto prematuro no Hospital Universitário da UFMS (n=19), Campo Grande – Mato Grosso do Sul, no período compreendido de janeiro 2013 a abril de 2014. Os critérios de inclusão foram: (1) Mulheres em parto prematuro, ≤ 36 semanas de gestação; (2) Presença de dentes nos quatro quadrantes da arcada dentária; (3) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pela parturiente (ou responsável, quando menores de idade) (APÊNDICE A). Para identificação dos perfis das gestantes foi aplicado questionário e realizada a avaliação clínica periodontal (APÊNDICE B e C). As exclusões foram feitas somente em caso da não obtenção do consentimento. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa de Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) – Protocolo N°2273 CAAE -0345.0.049.000-11 – ANEXO A.

4.2 Coleta de Amostras

As amostras coletadas neste estudo foram advindas de três locais: sangue do cordão umbilical (n=13), placenta (n=19) e biofilme dental (n=12) de dezenove pacientes, totalizando 44 amostras dos espécimes alvos. O número de amostras coletadas para cada espécime foram diferentes devido à oportunidade de coleta estar relacionada à situação de parto. Vale ressaltar que nove (09) mulheres tiveram a tríade completa coletada (sangue do cordão, placenta e exsudato do sulco gengival). Além destas, foram também analisadas amostras de DNA genômico de hilo placentário de arquivo (n=64), gentilmente cedidas por Migliolli (2003). Resumidamente para as dezenove mulheres, 600 μ l de sangue total de cordão umbilical, foram coletados em tubo heparinizado. Ao mesmo tempo, tecido placentário do hilo (~300 mg) foi obtido com bisturi e colocado imediatamente em microtubo contendo 500 μ l de *RNA later- RNA Stabilization Solution Soln.* (Ambion). Amostras de biofilme no exsudato do sulco gengival materno foram obtidas por meio de pontas de papel absorventes esterilizadas, técnica adaptada da proposta por Gaetti Jardim Jr *et al.* (2008). Para isto, a coleta foi feita pela própria pesquisadora. As pontas de papel eram introduzidas em dois sítios, buscando inicialmente o sulco gengival inflamado e caso não fosse detectado, a coleta era realizada no sulco aparentemente sadio. O papel absorvente no sulco foi deixado

permanecer por um (1) minuto. As amostras de placenta e exsudato em cone de papel foram coletadas em duplicata, mantidas em microtubo, contendo a solução *RNA later* e posteriormente armazenadas em freezer a -86°C , até o procedimento de extração do DNA.

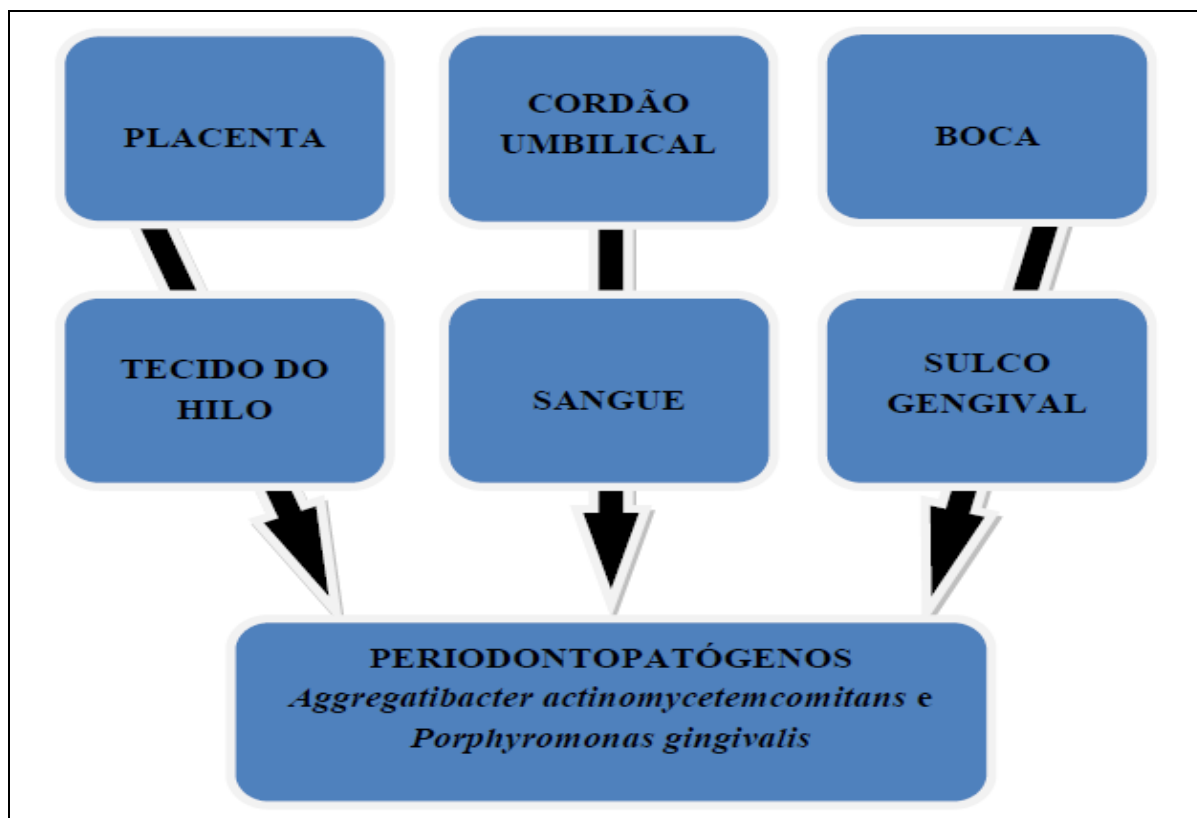


Figura 3 - Fluxograma de coleta dos espécimes, Campo Grande-MS, 2014

4.3 Extração do DNA genômico

A extração de DNA genômico das amostras de sangue do cordão umbilical e exsudato do sulco gengival, foi realizada segundo o método de Grimberg *et al.* (1989), com algumas modificações realizadas no Laboratório de Fisiologia Molecular e Genômica Funcional (NUFIGEN-ICB-UFGM). Resumidamente, 300 μl de sangue ou ~ 500 μl de lavado da ponta do cone absorvente de sulco gengival (i.e. a ponta do cone em RNA later era centrifugada a 5.000 rpm/ 30 min / 4°C . O sedimento ressuspense em Tampão de Lise Celular. As amostras foram colocadas em microtubos de 2ml, lavadas 1x em 1ml de tampão de lise celular e centrifugadas a 4.000 rpm/5 min./ 4°C . O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em 400 μl de tampão de digestão de proteínas contendo Proteinase K (250 ng/ μl) e as amostras foram incubadas a 55°C por pelo menos 2 horas, acompanhadas por agitação a cada 30 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm/5 min/ 4°C . O sobrenadante foi transferido para outro tubo, acrescentado 200 μl de 7,5 M LiCl_2 , agitado

por 5 segundos, colocado no gelo por 10 min e centrifugado a 13.000 rpm/15 min./ 4°C. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e transferido para novo tubo de 1,5 ml. O DNA genômico foi precipitado pela adição de 1 ml de 100% etanol seguido de centrifugação a 13.000 rpm/15min./ 4°C. O *pellet* de DNA foi lavado com 1 ml de 70% etanol e centrifugado novamente. Após o descarte do etanol o *pellet* de DNA foi deixado secar por ~30 min. e ressuspensionado em 12µl de tampão TE pH 7,5 para amostras de sulco gengival e 60µl para amostras de sangue.

Após a extração, o DNA genômico foi quantificado em espectrofotômetro (*NanoVue Plus Spectrophotometer* - GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Alíquotas de aproximadamente 10 ng de cada amostra foram utilizadas para PCRtr.

4.4 Extração de RNA e DNA de Placenta

4.4.1 Extração do RNA total e tratamento com DNase:

Extração do RNA total e tratamento com DNase das amostras de placenta foi realizada para verificar a presença ativa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*, através da expressão dos mRNAs da leucotoxina e da RNA polimerase, respectivamente. Para cada extração do RNA total utilizou-se ~300 mg de tecido placentário. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Stat-60®, segundo protocolo descrito pelo fabricante. O RNA total foi ressuspensionado em 25 ou 50 µl de água DEPC tratada, e uma alíquota de 2 µl utilizada para quantificação no *NanoVue Plus Spectrophotometer* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) em OD = 260 nm. Alíquotas de amostras de RNA total foram em seguida, tratadas com *Dnase I* (TURBO DNA-free kit, Ambion Inc., Foster, California, USA) para eliminação de traços de DNA genômico, extraídas com fenol, precipitadas com isopropanol e o *pellet* de RNA DNase tratado foi lavado com etanol e ressuspensionado em H₂O DEPEC (água ultra-pura, tratada com o inativador de RNases, dietilpirocarbonato). Após o tratamento com DNase, as alíquotas foram quantificadas novamente a 260 nm para posterior utilização na RT-PCR.

4.4.2 Extração do DNA genômico:

O DNA genômico das amostras de placenta foi obtido pela extração da fase orgânica proveniente da primeira etapa de extração de RNA pelo método do Stat-60[®], seguindo-se o protocolo do fabricante.

4.5 PCR em tempo Real

4.5.1 Oligonucleotídeos iniciadores específicos:

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para detecção da presença de DNA genômico dos micro-organismos *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (KOLODRUBETZ *et al.*, 1989) e *Porphyromonas gingivalis* (WATANABE *et al.*, 2011) através de PCR em tempo real (PCRtr) e estudo da expressão dos mRNAs da Leucotoxina e da RNA polimerase, respectivamente, por transcrição reversa (RT) e PCR em tempo real (RT-PCRtr), foram estudados, desenhados e selecionados a partir de análises das sequências descritas no *GeneBank*, utilizando-se o programa *Blastn* do site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Os iniciadores foram sintetizados na empresa IDT (*Integrated DNA technologies*; <http://www.idtdna.com>). Os primers foram recebidos liofilizados, ressuspensos em H₂O S.F. e aliquotados para armazenamento a -20°C, em estoques de 100 pmol/μl. Soluções de *primers* para uso foram diluídas a 10 pmol/μl. Os controles endógenos normalizadores utilizados foram o gene alvo da β-actina humana (*Primers* selecionados: P1 = 5'-tcaccacactgtgccatctacga-3' e P2 = 5'-cagcgggaaccgctcattgccaatgg-3' para um amplicon de 295 pb), e o RNA ribossomal S26 humano (hss26for = 5'- tgt gct tcc caa gct gta tgt gaa -3' e hss26rev = 5'- cga ttc ctg act act ttg ctg tg -3'; fragmento alvo de 75pb), previamente padronizados no NUFIGEN/ICB-UFGM.

4.5.2 PCR em tempo real

As amostras de DNA ou cDNA resultantes da RT (item 4.5.3) foram utilizadas na PCRtr. A PCRtr foi realizada no equipamento PRISM[®] 7500/ABI Sequence Detection System, utilizando-se o protocolo de reação descrito pelo SYBR Green PCR Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram aplicadas em placas de 384 poços (ABI PRISM[®] 384-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em um volume final de reação de 10 μL cada. Aliquotas

de 0,8 μ L de *template* das amostras foram pipetadas em cada canaleta da placa, adicionando-se posteriormente, 9,2 μ L de sybr Mix (5 μ L do SYBR Green PCR Master Mix Kit, 0,06 μ L de cada *primer* (senso e anti-senso a 10 pmol/ μ L) e água estéril filtrada (q.s.p. 10 μ L). A placa foi selada com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As reações de PCR em tempo real ocorreram no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 50°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. Para confirmação dos tamanhos dos fragmentos amplificados por PCR em Tempo Real, curvas de dissociação, como parte do programa estabelecido no PRISM® 7500/ABI e os fragmentos amplificados foram posteriormente visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata (CARVALHO *et al.*, 2000).

4.5.3 Transcrição reversa (RT):

A RT para síntese de scDNA (DNA complementar de fita simples) foi realizada a partir de 700 ng de RNA total (ítem 4.4.1) em volume final de reação de 21 μ L por amostra. Resumidamente, 700 ng de RNA foram pre-incubados a 70°C por 10 minutos com 10 pmol de cada *primer* reverso, específico para os genes alvos em estudo, juntamente com 10 pmol de *primer* oligo dT18 (Invitrogen), seguido de armazenamento em gelo na bancada. Em seguida, 11 μ L do mix de enzima transcriptase reversa (40 U) em tampão RT (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4) contendo 2 μ L de dNTP mix (10 mM de cada) foram incubados a 45°C por 1 hora, com a solução de RNA e *primers* previamente descrita. A reação foi finalizada a 4°C e imediatamente utilizada na PCRtr. Todos os reagentes foram provenientes da Invitrogen™ (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR).

4.6 Microscopia confocal

Para a avaliação microscópica confocal, cinco fragmentos de placenta humana com aproximadamente duzentos miligramas e positivas para *Porphyromonas gingivalis*, foram fixadas por imersão em solução de formaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,05M pH 7,2, por 24 horas, a 4°C. Após este período, as amostras foram lavadas por várias vezes em tampão fosfato a 0,05M e pH 7,2, e armazenadas a 4°C. Os fragmentos foram desidratados em série crescente de álcoois e infiltrados em parafina para posterior inclusão. Após polimerização dos blocos, foram obtidos cortes histológicos de 3 e 5 μ m de espessura, utilizando-se navalhas de

vidro (preparadas em *Knife maker* da LKB, modelo 7880B), no micrótomo Reichert Jung (mod. 1140 / Autocut). Após terem sido distendidos em água destilada, os cortes foram colocados em lâminas histológicas, desparafinados em xilol e secos em chapa quente a 60°C. As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS (Tampão fosfato-salino) e incubadas por 1 hora em solução de bloqueio (0,9% pbs + 1% bsa (albumina sérica bovina) + 5 % goat sérum (*blocking solution*) + 0,5% triton (4-(1,1,3,3-tetrametilbutilfenil-polietileno glicol))). Após o tratamento, os tecidos foram incubados com (phalloidin-green (1:20), DAPI ((2-(4-amididino-fenil)-1H-indol-6-carboxamida) (1:500) e PI (Iodeto de Propídio) (1:800)), por 1 hora. As lâminas foram lavadas com PBS novamente e montadas com *bálsamo do Canadá*. O material foi analisado no microscópio invertido LSM 510 Axiovert 200 M, fabricado pela Carl Zeiss. As imagens digitais obtidas foram tratadas para ajuste de tons de cinza, contraste, brilho e foco, utilizando-se o programa Adobe Photoshop CS4. Em seguida, essas imagens foram montadas em pranchas utilizando-se o programa Adobe Illustrator CS4.

4.7 Análise estatística

Para a quantificação relativa foi realizada uma análise comparativa da expressão dos transcritos dos genes alvo com o controle endógeno, utilizando-se o método CT comparativo (Livac; Schmittgen, 2001) onde o controle endógeno foi utilizado para normalizar a expressão dos genes alvos (média do CT gene alvo – média do CT controle endógeno) gerando o ΔCT . Utilizando-se o ΔCT calculou-se o $\Delta\Delta CT$ (ΔCT amostra – ΔCT do calibrador (amostra de referência)). Ao final aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ para determinação dos níveis relativos de expressão de cada gene alvo.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção dos *primers* específicos

Os *primers* selecionados para diagnóstico e estudos de expressão por PCRtr da Leucotoxina de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e RNA polimerase da *Porphyromonas gingivalis*, são apresentados na **tabela 1**. As sequências alvos foram pesquisadas exaustivamente no *Blastn*, os oligonucleotídios iniciadores *sense* e *anti-sense* de aproximadamente 21-24 nt contendo ~ 50% GC (**figuras 4 e 5**) foram determinados. Os *amplicons* alvos variaram de 72 pb a 254 pb.

Tabela 1 - Oligonucleotídios iniciadores selecionados, tamanho (nt) e fragmento alvo (pb), para a detecção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* através de PCRtr, Campo Grande –MS, 2014

Iniciadores	Sequência de oligonucleotídios	Tamanho (nt)	Fragmento alvo (pb)
ACOMLEUKFOR	5'-CTA GG T ATT GCG AAA CAA TTT G-3',	22	254
ACOMLEUKREV	5'-CCT GAA ATT AAG CTG GTA ATC-3'.	21	
PGINGFOR01	5'- GAT GCA TAA CGA CGA GCT TCT CGT -3'	24	183
PGINGREV02	5'- CAC TGC AGA CCA AGA GCT TCA TGT -3'	24	
PGINGREV03	5'- ACG TTA TCT GCG GTC ACC TCA TTC -3'	24	72 (01+03)

(nt) – nucleotídeo, (pb) – pares de base.

FRAGMENTO ALVO PARA PCR DE 254 PB

ACOMLEUKFOR>>>ctaggtattgcgaaacaatttgatcgtgcgagaatgcttgaggaatactcgaaac
gctttaagaaatttggtataacggcgatagttacttgggtcaattctacaaaaatacagggatcgagatgctgcgatta
caacgattaacactgtattaagtgtattgcagcaggggttgggtgcagcctccgcggttcttagttgggtgcgccaat
cggtttgtagtgagtgcgattaccagcttaatttcagg<<<ACOMLEUKREV

Figura 4 - Oligonucleotídeos iniciadores e respectivos amplicons para detecção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* através PCRtr.

* Sequência original obtida de Kolodrubetz et al., (1989)

FRAGMENTO ALVO PARA REAL TIME (183 PB)

PGINGREV02>>>cactgcagaccaagagcttcattgccgcggcctctttccaagagacaaccaaggtg
ctgaatgaagcagctatctgttggaagaccgactacgtggaaggactgaaggaaa
(PGINGREV03)>>>>acgttatctgcggtcacctcattccggccggtactggtttgcgcgatt<<<<<
< acgagaagctcgtcggttatgcatc (PGINGFOR01)

FRAGMENTO ALVO PARA REAL TIME (72 PB)

>>>>acgttatctgcggtcacctcattccggccggtactggtttgcgcgatt<<<<<<acgagaagctcgtcg
ttatgcatc

Figura 5 - Oligonucleotídeos iniciadores e respectivos amplicons para detecção de *Porphyromonas gingivalis* através de PCRtr.

* Sequencia original obtida de Watanabe et al., (2011).

5.2 Resultados da PCRtr e avaliação

Para desenvolvimento da PCRtr para diagnóstico e estudos de expressão gênica de Leucotoxina e RNA polimerase, foram extraídas amostras de DNA genômico e RNA quantificados como descrito anteriormente, apresentados no Apêndice E, para espécimes de exsudato de sulco gengival ($n=12$; 369 ± 119 ng), placenta ($n=19$; 8134 ± 5427 ng) e sangue de cordão umbilical ($n=13$; $83\pm32,5$ ng).

As amostras de DNA foram testadas para a presença dos micro-organismos e os resultados da amplificação dos fragmentos alvos demonstrando a especificidade dos *primers* selecionados, pelas curvas de amplificação e de dissociação na PCRtr da **figura 6**.

Algumas amostras positivas e negativas da PCRtr, escolhidas aleatoriamente, estão demonstradas nos géis de poliacrilamida, corados com nitrato de prata, confirmando os *amplicons* de tamanhos específicos, mostrados nas **figuras 7 a 10**. Algumas vezes os *amplicons* de *P. gingivalis* apresentaram padrão eletroforético variável, provavelmente sugerindo variabilidade de cepas, o que teria que ser confirmado por posterior sequenciamento.

A amplificação de B-actina em amostras de DNA genômico foi mais rara nos espécimes de sangue de cordão umbilical (31%) e biofilmes (83%), devido à variabilidade da presença de leucócitos nestes espécimes (**Tabela 2**). Amostras de sangue de cordão umbilical forneceram, praticamente a porção do plasma, porque foram congeladas a -80°C , ou seja, poucos elementos figurados do sangue estavam presentes nas alíquotas analisadas. Ainda assim, o sangue de cordão umbilical foi viável para a detecção de DNA genômico dos micro-organismos investigados. As placentas apresentaram 95% de detecção de B-actina.

As **Tabelas 2 a 4** sintetizam os resultados e achados de DNA genômico nos diferentes espécimes dos indivíduos estudados. Em adição, uma avaliação conclusiva dos percentuais de detecção dos micro-organismos é apresentada nas respectivas **Figuras 12 e 13**, a partir de cada tabela. A PCRtr apresentou uma detecção bastante semelhante de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, em torno de 15%, nos três espécimes, entretanto, as amostras de biofilme das mães apresentaram o maior percentual de 16,7%. Estes achados estão de acordo com os quadros clínicos apresentados na **Tabela 5** e **Figura 14**, demonstrando os resultados da avaliação periodontal das mães. Os dados mostram a presença de 50% de sangramento, 83% de cálculos e 17% de formação de bolsa. Por outro lado a prevalência de *Porphyromonas gingivalis* foi elevada nos espécimes estudados, isto é, 100%

no sangue de cordão umbilical, 95% no tecido de hilo placentário e 83% dos biofilmes de sulco gengival materno. O **Quadro 2** concentra todos os achados supra citados.

A Aplicação da PCRtr do presente trabalho na triagem de placentas foi também realizada em DNA genômico arquivado no NUFIGEN (MIGLIOLI, 2003), proveniente de pacientes com histórico de infecção pré-natal. Os resultados desta triagem são apresentados na **Figuras 15**, mostrando as curvas de amplificação dos fragmentos alvos dos genes da leucotoxina de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e do gene alvo da RNA polimerase da *Porphyromonas gingivalis*, respectivamente. Os dados mostram que das 64 placentas de pacientes com suspeita de infecção pre-natal selecionadas aleatoriamente, 2 (3,1%) foram positivas para *Aggregatibacter* e 32 (50%) positivas para *Porphyromonas*. Os dados novamente mostram uma prevalência placentária de *Porphyromonas gingivalis* (**figura 16**).

5.3 Resultados de RT-PCRtr e microscopia confocal

A **Figura 17** mostra os resultados típicos obtidos pela RT-PCRtr a partir de RNA total de placenta. Este estudo visou a avaliação da expressão da Leucotoxina e da RNA polimerase de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*, respectivamente, após correção com o normalizador S26 RNA ribossomal humano. As respectivas curvas de dissociação à direita caracterizam a especificidade dos primers. O resultado da expressão relativa destes genes por amostra, é apresentado na **Figura 18**. Os dados mostram que dentre as 16 amostras de placenta avaliadas, 5 (31%) apresentaram expressão de Leucotoxina da *Aggregatibacter*, e 12 (75%) apresentaram a expressão de RNA polimerase específica da *Porphyromonas gingivalis* (**Tabela 6**). Estes achados mostram que nas placentas PCRtr positivas para estes micro-organismos existe uma grande porcentagem de bactérias viáveis, isto é, expressando proteínas relevantes para sua proliferação neste espécime. Além disto, a RT-PCR mostra que amostras de placenta não positivas inicialmente para *Aggregatibacter*, apresentaram expressão de sua proteína de adesão, a leucotoxina.

Todos os dados deste trabalho indicam uma prevalência de *Porphyromonas gingivalis* nos espécimes estudados. Além disto, os dados de microscopia confocal apresentados na **Figura 19** reforçam estes achados, sugerindo a presença de material genético bacteriano. A foto micrografia confocal das vilosidades da placenta materna apresentaram células trofoblásticas contendo sinais de formação de vacúolos significativos quanto a presença de bactérias e material genético extra-nuclear, sugestivo de *Porphyromonas gingivalis*. As células foram coradas com *phalloidin green* para actina (cores verde e azul). O

material genético foi corado com DAPI (-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida) e PI (Iodeto de Propídio) verde e vermelho.

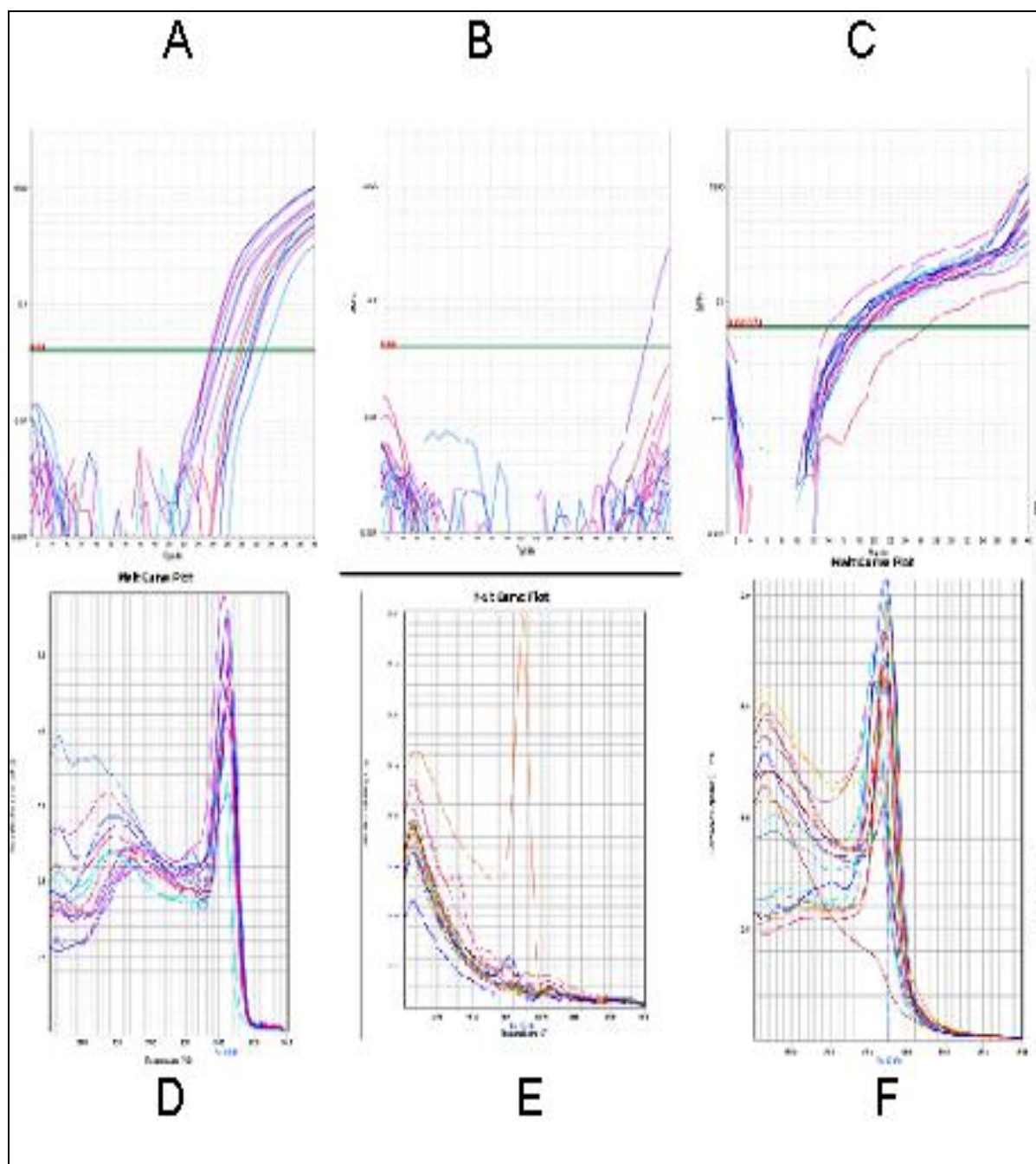


Figura 6 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr. As letras A, B e C representam as curvas de amplificação dos fragmentos alvos para β -actina humana, Leucotoxina da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e RNA polimerase da *Porphyromonas gingivalis*, respectivamente, a partir de alíquotas de DNA genômico de placenta. D, E e F demonstram as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade dos *primers*.

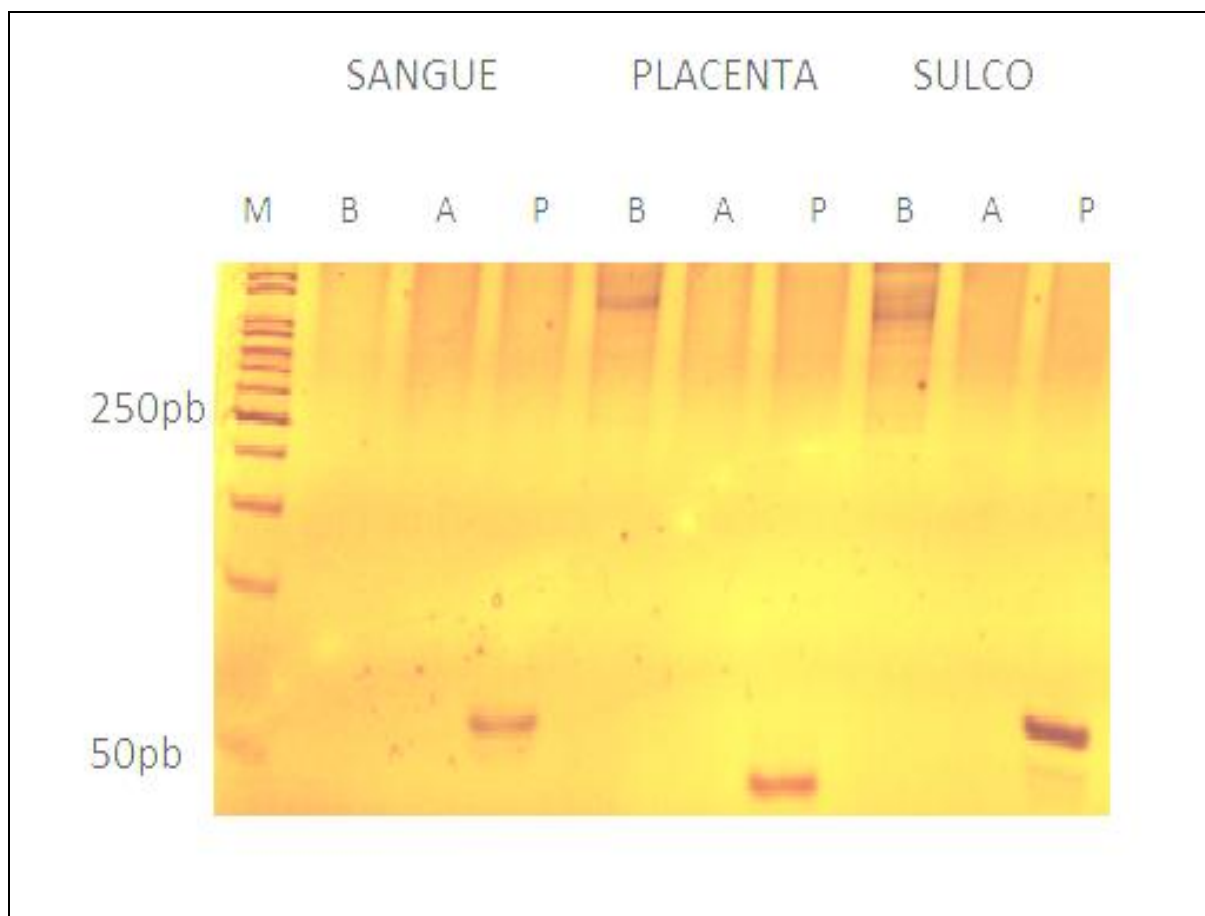


Figura 7 - Resultado típico de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata de PCRtr para diagnóstico em três espécimes de fontes diferentes. (B) β actina; (A) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e (P) *Porphyromonas gingivalis*. (M) marcador 50 pb DNA ladder. As amostras são de três pacientes distintos que apresentaram positividade para *Porphyromonas gingivalis* (Fragmento alvo de 72 pb). O fragmento de 254 pb da β actina é levemente observado em placenta e sulco gengival.

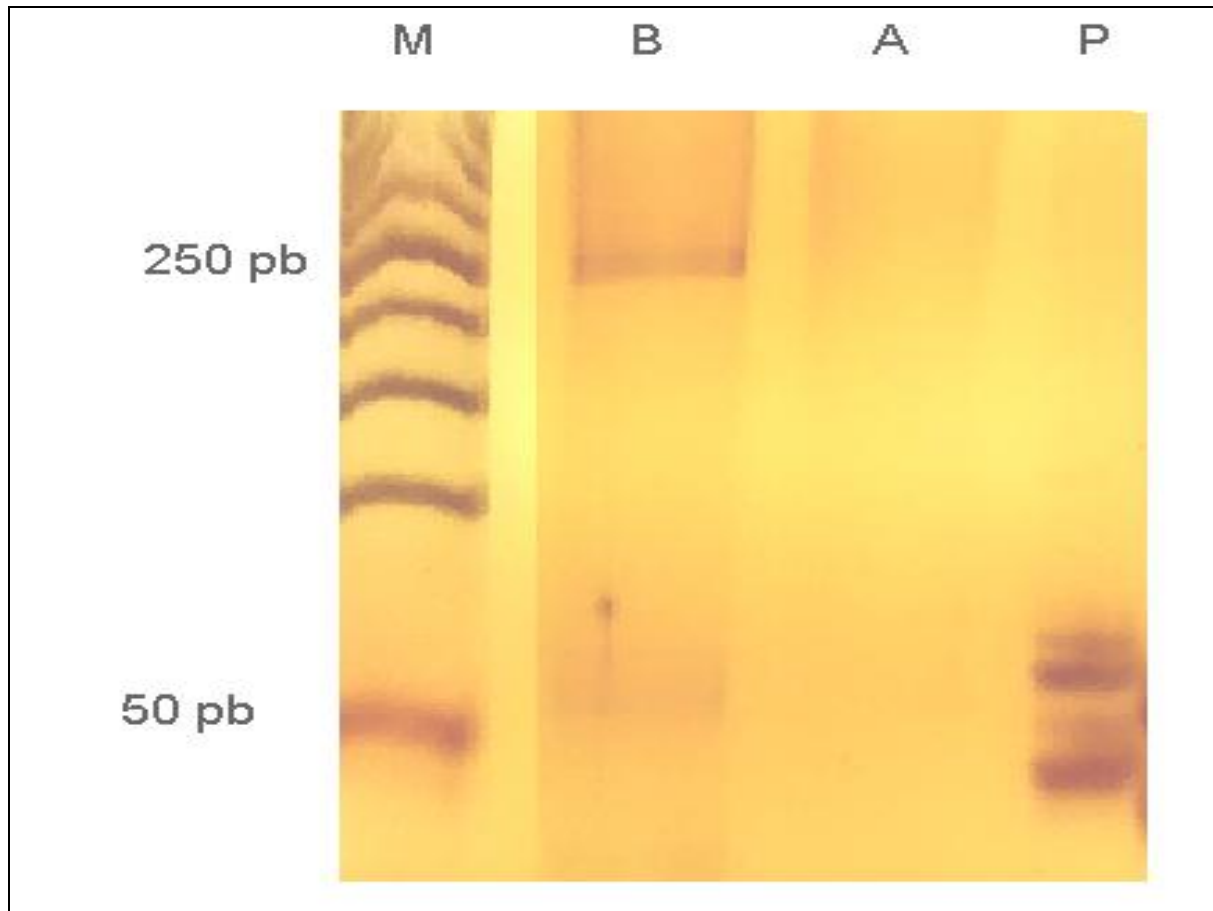


Figura 8 - Resultado típico de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata da PCRtr. (M) marcador 50 pb DNA ladder; (B) β -actina; (A) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; (P) *Porphyromonas gingivalis*. Os amplicons de 254 e 72 pb, para β -actina e *Porphyromonas gingivalis*, respectivamente, são demonstrados em exsudato de sulco gengival de uma mesma mãe.

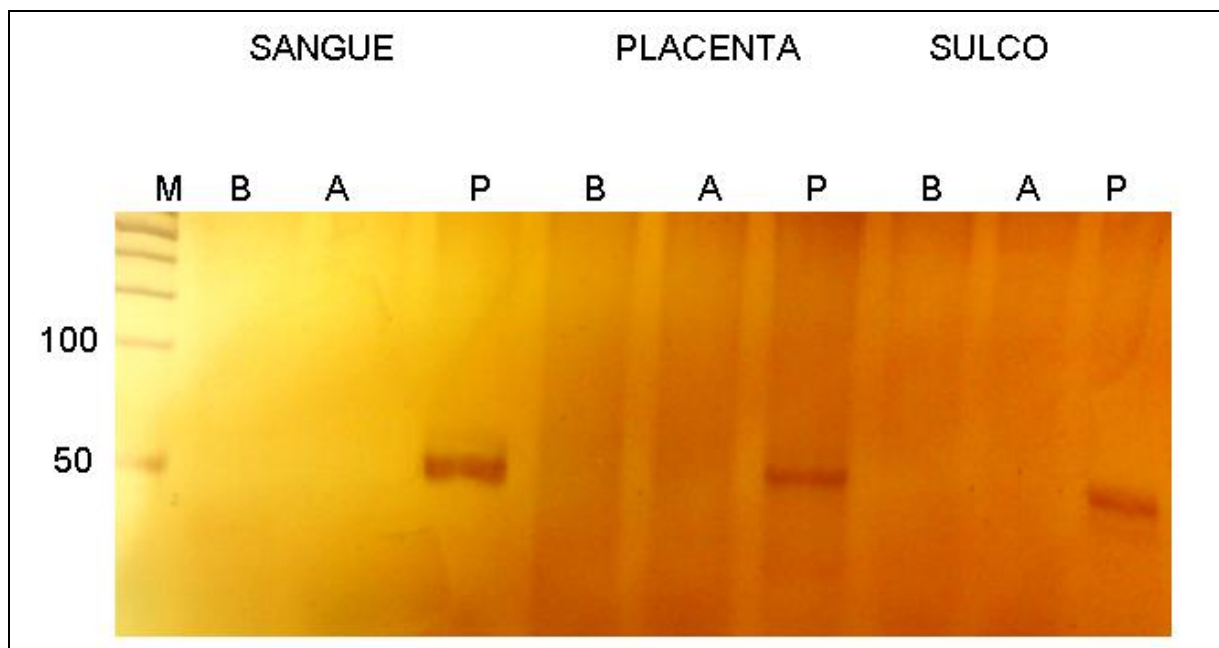


Figura 9 - Resultado típico de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata da PCRtr. (M) marcador 50 pb DNA *ladder*; (B) β -actina; (A) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; (P) *Porphyromonas gingivalis*. O amplicon de 72 pb é demonstrado em todos os espécimes obtidos da mesma mãe

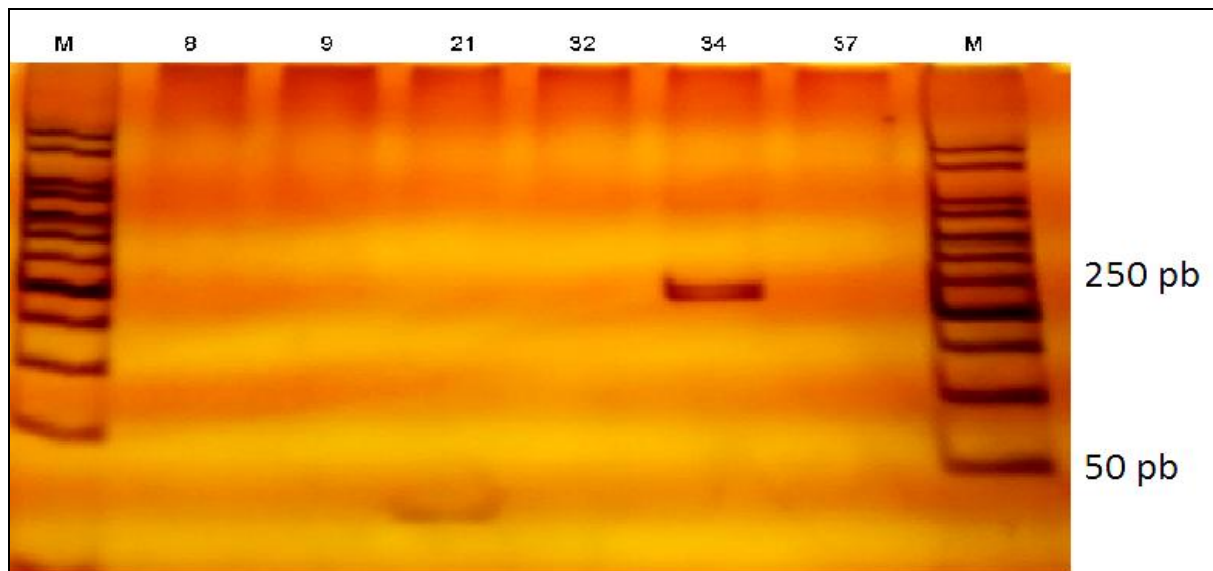


Figura 10 - Resultado típico de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata da PCRtr para diagnóstico de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*. (M) marcador 50 pb DNA ladder; (8 e 9) amostras de sangue de cordão umbilical, (21, 32) amostras da placenta e (37) exsudato de sulco gengival, apresentaram-se negativas. Amostra 34 de exsudato de sulco gengival de uma mãe apresentando positividade.

Tabela 2 - Resultado de detecção de β -actina por PCRtr em diferentes espécimes, sangue do cordão umbilical (s), hilo placentário(p), exsudato do sulco gengival materno, Campo Grande – MS, 2014

Amostra (a)	Sangue de cordão umbilical (s)	Tecido do hilo placentário (p)	Exsudato do sulco gengival materno (sg)
01	-	+	+
02	-	+	-
03	+	+	#
04	-	+	+
05	-	+	+
06	-	+	+
07	#	+	+
08	-	-	-
09	+	+	+
10	#	#	+
11	#	+	#
12	- -*	++*	+
13	#	#	+
14	+	+	#
15	#	+	#
16	#	+	#
17	#	+	#
18	- #*	++*	+
19	+	+	#
(n=19)	(n=13)	(n=19)	(n=12)
Positivas	4	18	10
(%)	30,7	94,7	83,3

(a) referência da amostra; (s) sangue de Cordão umbilical; (p) hilo placentário; (sg) exsudato de sulco gengival materno e respectivos resultados (+) amostra positiva (-) não detectado, e (#) não se aplica; HU/UFMS, MS, 2013/14;*Gemelaridade, a mesma mãe com duas coletas distintas de sangue e placenta;

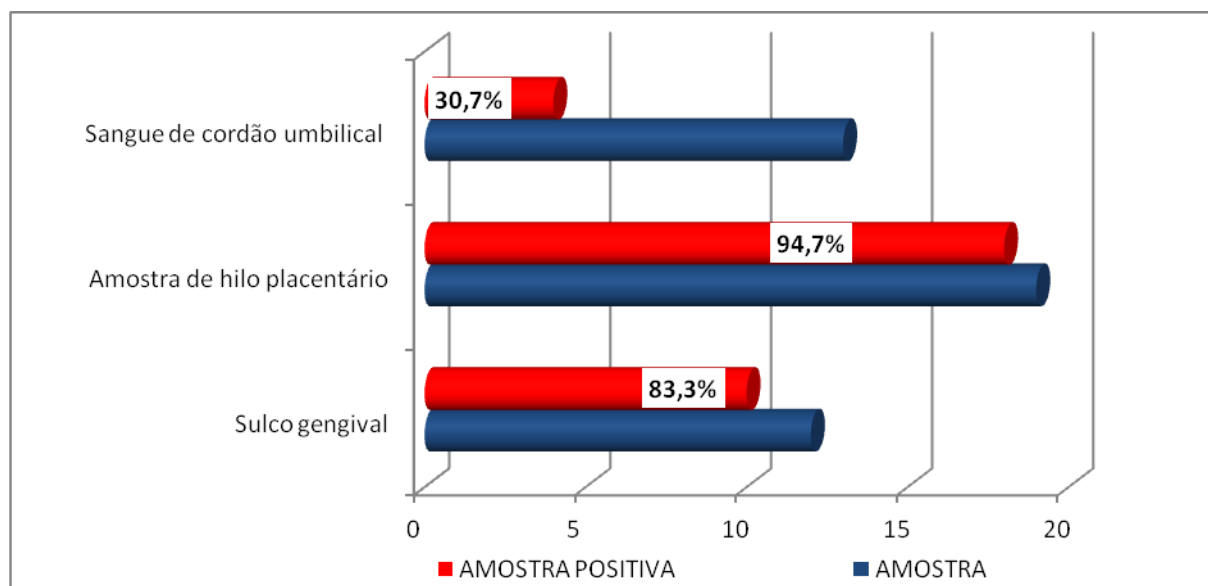


Figura 11 - Resultado de detecção de β -actina por PCRtr em diferentes espécimes, (s) sangue de Cordão umbilical (n=13); (p) hilo placentário (n=19); (sg) exsudato de sulco gengival materno (n=12) e respectivos resultados positivos em percentuais, Campo Grande - MS, 2014

Tabela 3 - Resultado de detecção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por PCRtr em diferentes espécimes: (a) referência da amostra; (s) sangue de Cordão umbilical ; (p) tecido do hilo placentário; (sg) exsudato de sulco gengival materno, Campo Grande –MS, 2014

Amostra (a)	Sangue de cordão umbilical (s)	Tecido do hilo placentário (p)	Exsudato de sulco gengival materno (sg)
01	-	-	+
02	-	-	-
03	+	-	#
04	-	-	-
05	-	-	-
06	-	-	-
07	#	-	-
08	-	-	-
09	-	-	+
10	#	#	-
11	#	-	#
12	- -*	- -*	-
13	#	#	-
14	-	-	#
15	#	-	#
16	#	-	#
17	#	+	#
18	- #*	++*	-
19	+	-	#
(n=19)	(n=13)	(n=19)	(n=12)
Positivas	2	03	2
(%)	15,3	15,8	16,7

(+) amostra positiva, (-) não detectado e (#) não se aplica; *Gemelaridade, a mesma mãe com duas coletas distintas de sangue e placenta

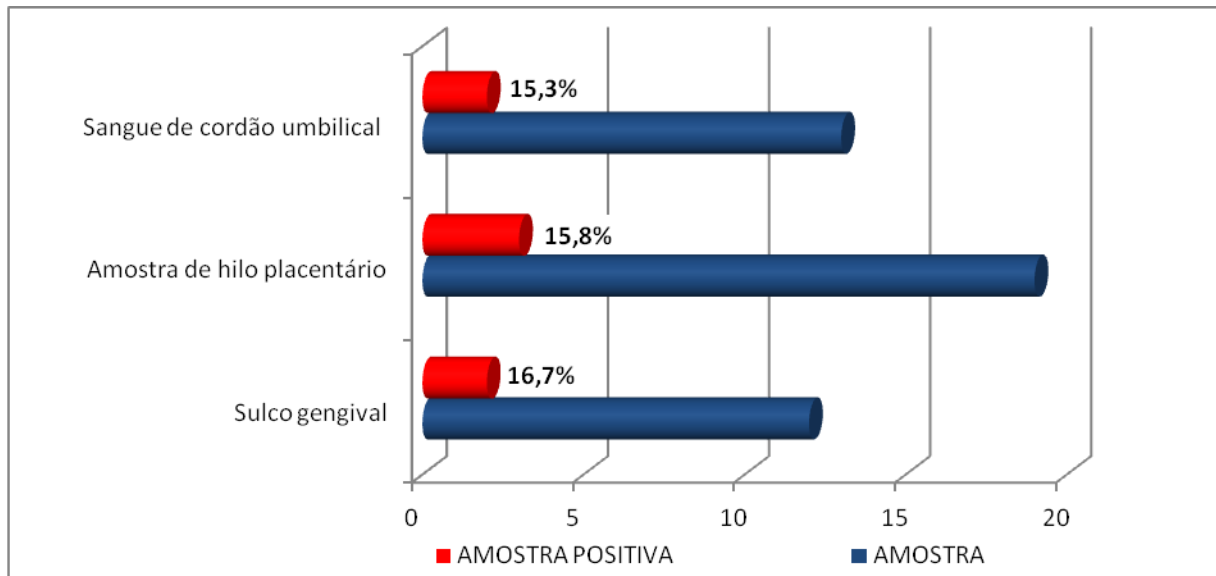


Figura 12 - Resultado de detecção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por PCRtr em diferentes espécimes, (s) sangue de Cordão umbilical (n=13); (p) hilo placentário (n=19); (sg) exsudato de sulco gengival materno (n=12) e respectivos resultados positivos em percentuais, Campo Grande - MS, 2014

Tabela 4 - Resultado de detecção de *Porphyromonas gingivalis* por PCRtr em diferentes espécimes: : (a) referência da amostra; (s) sangue de Cordão umbilical ; (p) tecido do hilo placentário; (sg) exsudato de sulco gengival materno, Campo Grande - MS, 2014

Amostra (a)	Sangue de cordão umbilical (s)	Hilo placentário (p)	Exsudato de sulco gengival materno (sg)
01	+	+	+
02	+	+	-
03	+	+	#
04	+	+	+
05	+	+	-
06	+	+	+
07	#	+	+
08	+	+	+
09	+	+	+
10	#	#	+
11	#	+	#
12	++*	++*	+
13	#	#	+
14	+	-	#
15	#	+	#
16	#	+	#
17	#	+	#
18	+ #*	++*	+
19	+	+	#
(n=19)	(n =13)	(n=19)	(n=12)
Positivas	13	18	10
(%)	100	94,7	83,3

(+) amostra positiva, (-) não detectado e (#) não se aplica; *Gemelaridade, a mesma mãe com duas coletas distintas de sangue e placenta

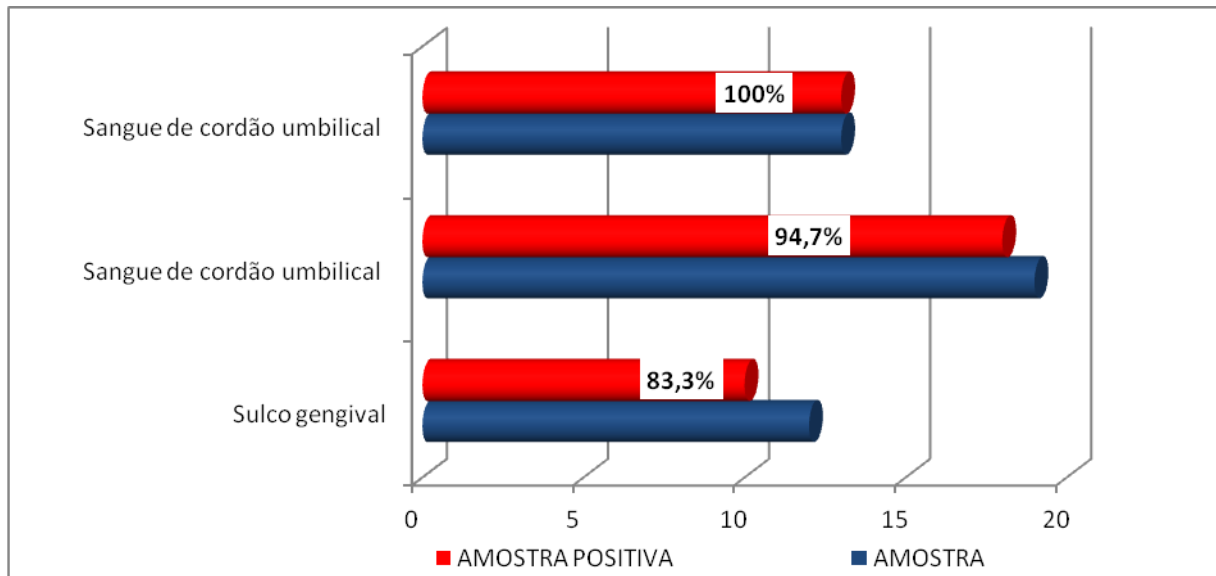


Figura 13 - Resultado de detecção de *Porphyromonas gingivalis* por PCRtr em diferentes espécimes, (s) sangue de Cordão umbilical (n=13); (p) hilo placentário (n=19); (sg) exsudato de sulco gengival materno (n=12) e respectivos resultados positivos em percentuais, Campo Grande – MS, 2014

Tabela 5 - Resultado da avaliação periodontal, código da mãe, e referência a presença (+), ausência (-), não se aplica (#) quanto a sangramento, cálculo e bolsa periodontal, Campo Gande - MS, 2014

Código Mãe	Sangramento	Cálculo	Bolsa
A	+	+	+
B	-	-	-
C	#	#	#
D	-	+	-
E	-	+	-
F	-	+	-
G	+	+	+
H	+	+	-
I	-	+	-
J	+	+	-
K	#	#	#
L1*	-	-	-
L2*	#	#	#
M	+	+	-
N	#	#	#
O	#	#	#
P	#	#	#
Q	#	#	#
R1*	+	+	-
R2*	#	#	#
S	#	#	#
(n=19)	(n=12)	(n=12)	(n=12)
Positivas	6	10	2
(%)	50,0	83,3	16,7

*Código para a mesma mãe/gemelaridade e numeração correspondente ao bebê;

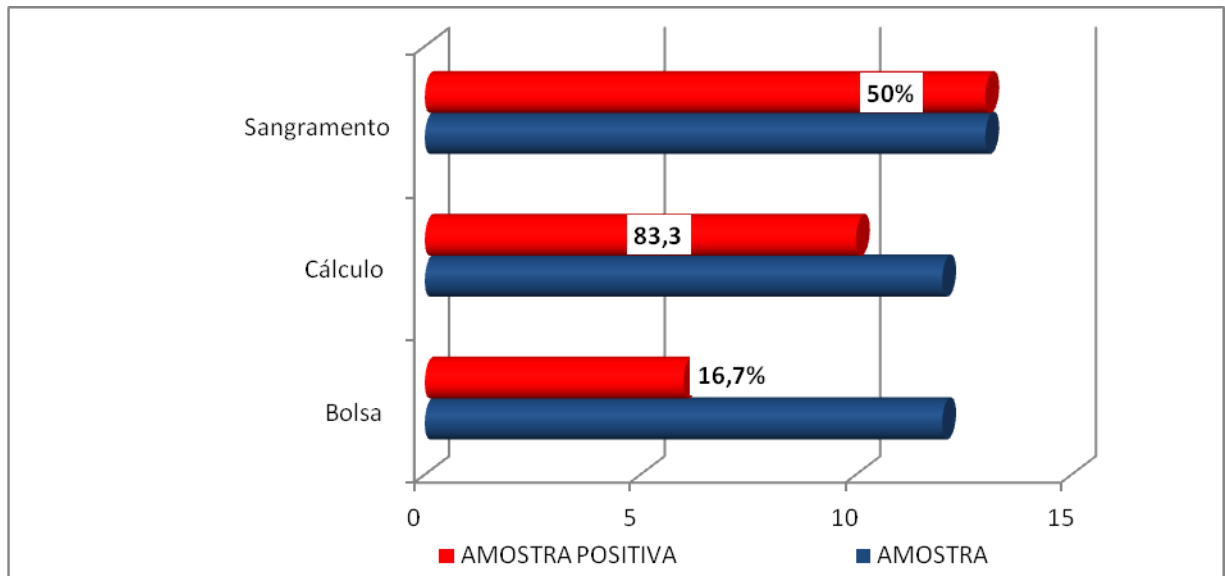


Figura 14 - Avaliação periodontal materna (n=12) referente a sangramento, cálculo e bolsa, e respectivos resultados positivos em percentuais, Campo Grande-MS, 2014.

Quadro 2 - Resultado de detecção de β -actina, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* por PCRtr em diferentes espécimes, por amostra e expressão relativa da *Porphyromonas gingivalis* e avaliação periodontal materna de sangramento, cálculo e bolsa, Campo Grande-MS, 2014

Código Mãe	Nº da amostra Sangue	β	Aa	Pg	Nº da amostra Placenta	β	Aa	Pg	ER Pg/ß	Nº da amostra Sulco gengival	β	Aa	Pg	Sang	Cálculo	Bolsa
A	6	-	-	+	28	+	-	+	0,8	37	+	+	+	+	+	+
B	5	-	-	+	27	+	-	+	1,5	39	-	-	-	-	-	-
C	9	+	+	+	14	+	-	+	1,5	#	#	#	#	#	#	#
D	12	-	-	+	26	+	-	+	1,6	44	+	-	+	-	+	-
E	7	-	-	+	18	+	-	+	2,0	41	+	-	-	-	+	-
F	11	-	-	+	20	+	-	+	1,6	42	+	-	+	-	+	-
G	#	#	#	#	23	+	-	+	1,5	35	+	-	+	+	+	+
H	4	-	-	+	15	-	-	+	#	36	-	-	+	+	+	-
I	2	+	-	+	24	+	-	+	1,8	34	+	+	+	-	+	-
J	#	#	#	#	#	#	#	#	#	43	+	-	+	+	+	-
K	#	#	#	#	16	+	-	+	1,5	#	#	#	#	#	#	#
L*	10	-	-	+	19	+	-	+	1,9	33	+	-	+	-	-	-
L*	13	-	-	+	30	+	-	+	0,8	#	#	#	#	#	#	#
M	#	#	#	#	#	#	#	#	#	38	+	-	+	+	+	-
N	1	+	-	+	22	+	-	-	#	#	#	#	#	#	#	#
O	#	#	#	#	29	+	-	+	1,6	#	#	#	#	#	#	#
P	#	#	#	#	31	+	-	+	0,9	#	#	#	#	#	#	#
Q	#	#	#	#	21	+	+	+	1,0	#	#	#	#	#	#	#
R*	3	-	-	+	17	+	+	+	1,4	40	+	-	+	+	+	-
R*	#	#	#	#	32	+	+	+	1,7	#	#	#	#	#	#	#
S	8	+	+	+	25	+	-	+	1,6	#	#	#	#	#	#	#
(n=19)	(n=13)	4	2	12	(n=19)	18	3	18	#	(n=12)	10	2	10	6	10	2
(%)	100	30,7	15,3	100	100	94,7	15,8	94,7	#	100	83,3	16,7	83,3	50,0	83,3	16,7

Codificação por amostra; (s) sangue de Cordão umbilical; (P) amostra de hilo placentário; (sg) exsudato de sulco gengival materno; Número da amostra - corresponde a numeração e disposição na placa para PCRtr nos diferentes espécimes; (β) β -actina; (Aa) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; (Pg) *Porphyromonas gingivalis*; (+) amostra positiva; (-) não detectado (#), não se aplica. (ER Pg/ß) expressão relativa. %-percentual;

*Gemelaridade, coletas de sangue e placenta distintas;

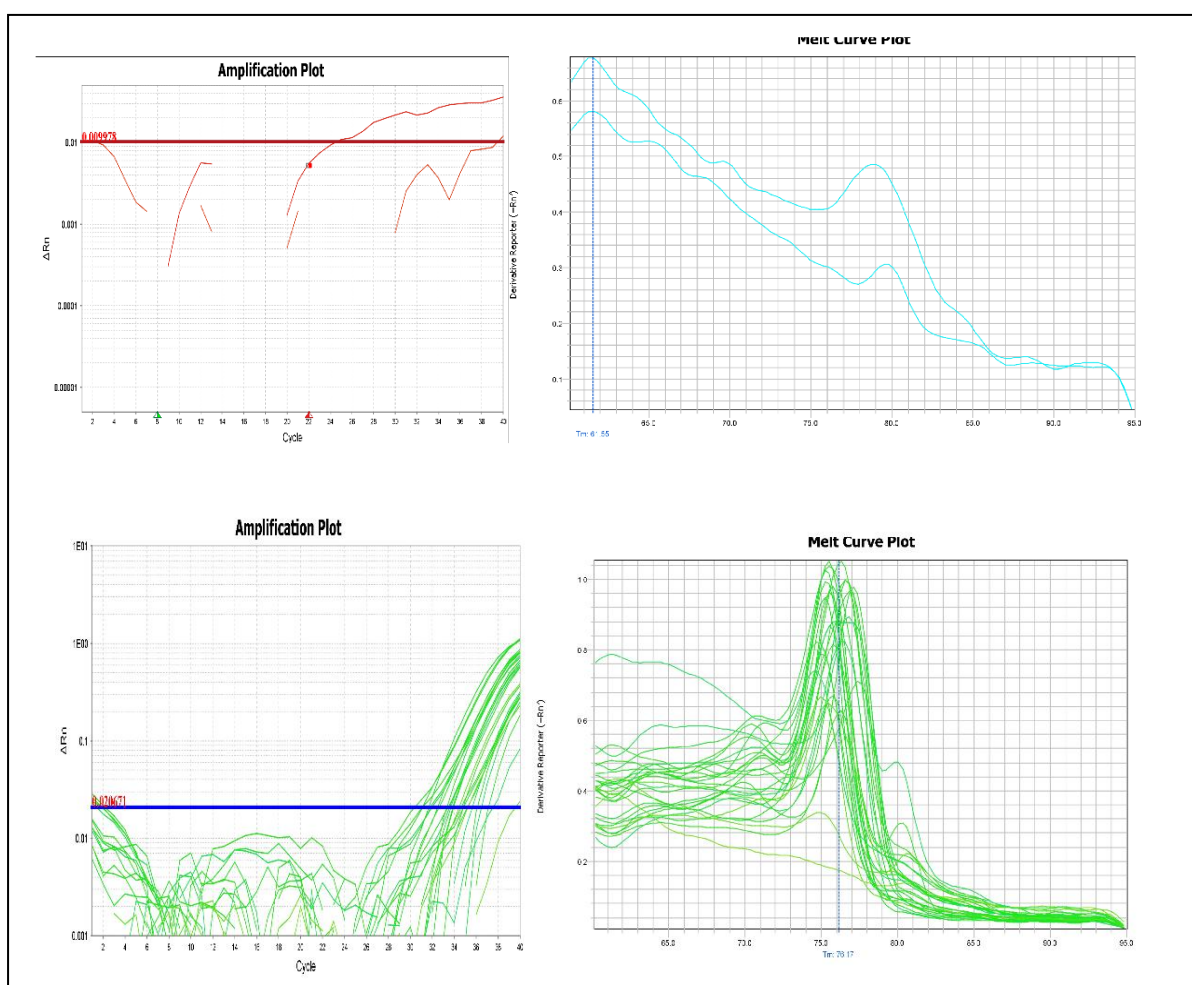


Figura 15 - Resultados típicos obtidos pela PCRtr. As figuras à esquerda representam as curvas de amplificação dos fragmentos alvos para Leucotoxina da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e RNA polimerase da *Porphyromonas gingivalis*, respectivamente, a partir de alíquotas de DNA genômico de placentas de pacientes com suspeita de infecção pré-natal selecionadas aleatoriamente (n=64). Os gráficos à direita mostram as respectivas curvas de dissociação que caracterizam a especificidade dos primers.

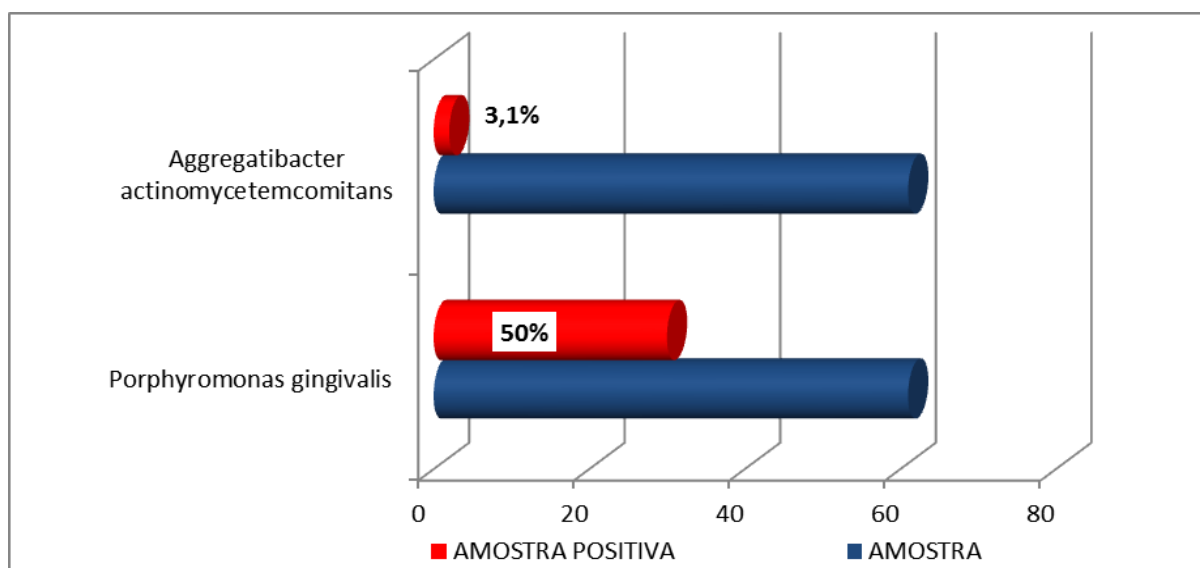


Figura 16 – Resultados de detecção na placenta de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*, por PCRtr em amostras de arquivo de Miglioli, (2003)

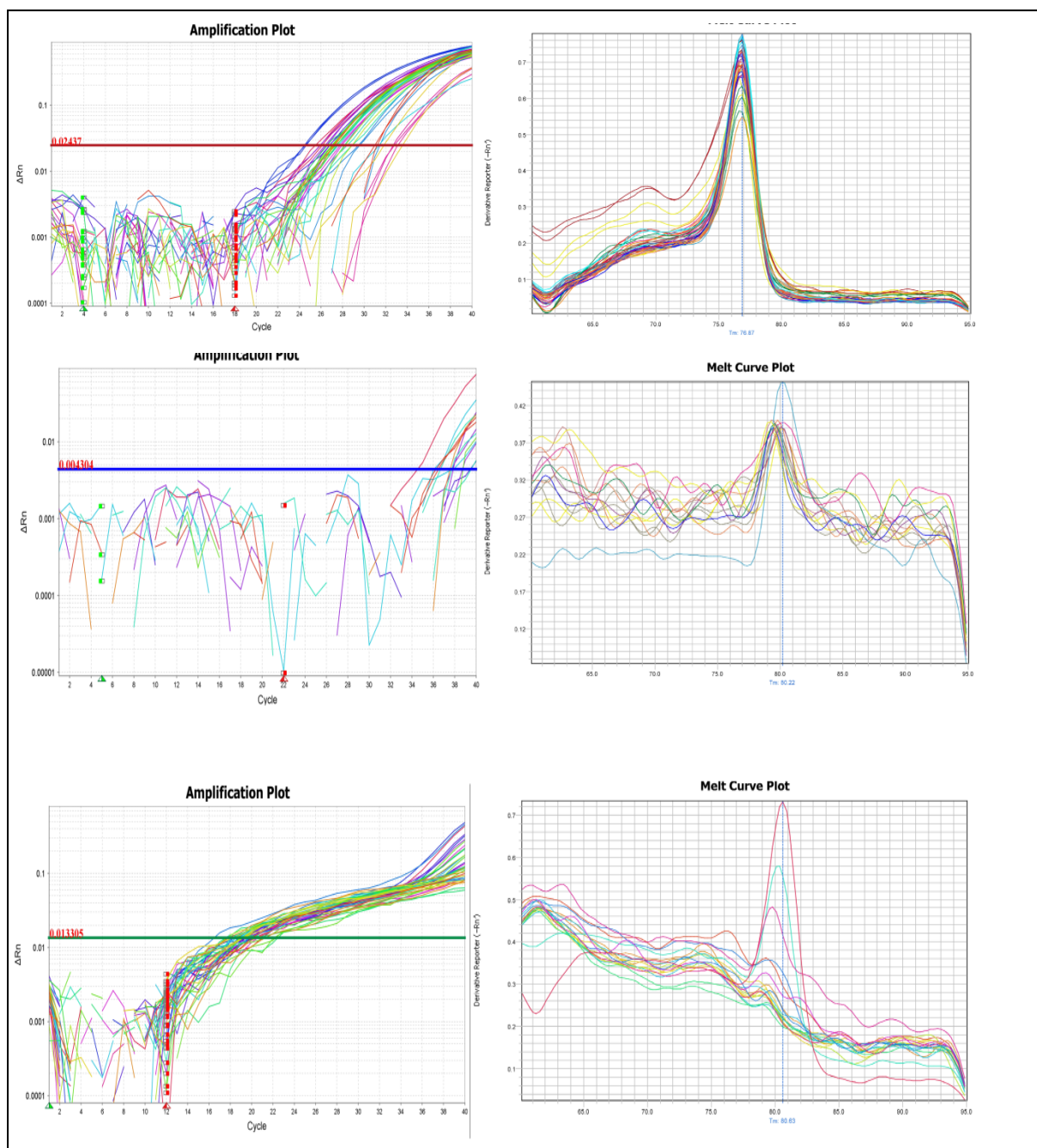


Figura 17 - Resultados típicos obtidos pela RT-PCRtr. As curvas de amplificação dos fragmentos alvos para S26 humano, Leucotoxina da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e RNA polimerase da *Porphyromonas gingivalis*, respectivamente de cima para baixo à esquerda, a partir de RNA total de placenta. As respectivas curvas de dissociação estão à direita e caracterizam a especificidade dos *primers*.

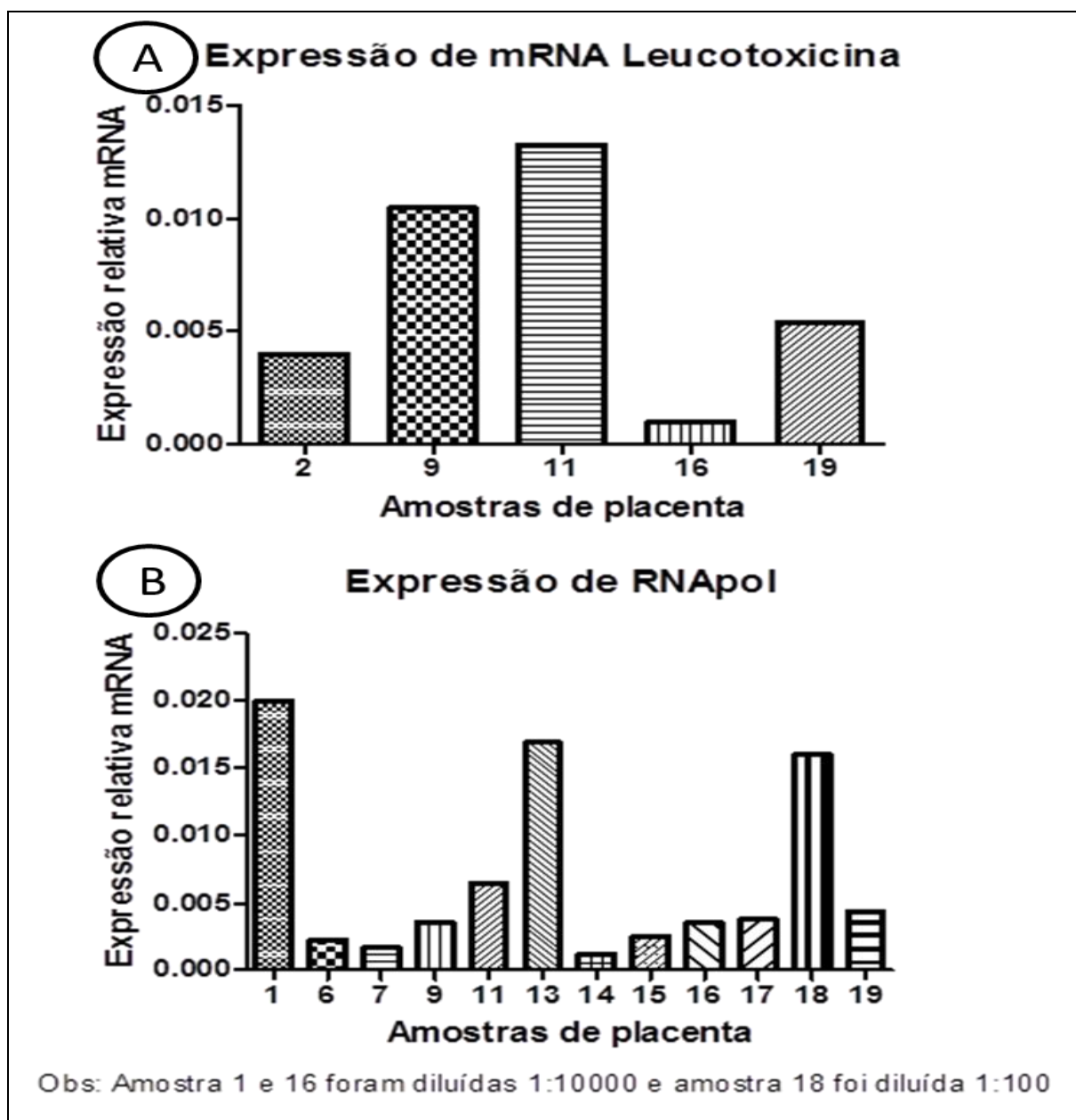


Figura 18 - Expressão de mRNAs para Leucotoxina de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* e RNA polimerase da *Porphyromonas gingivalis*, através de RT-PCRtr. (A) Comparação de expressão de mRNA para Leucotoxina entre amostras placentárias positivas para a presença de *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*. (B) Comparação de expressão de mRNA para a enzima RNA polimerase bacteriana da *Porphyromonas gingivalis*. As barras representam os valores relativos de expressão obtidos pelo método estatístico de $2^{(-\Delta Ct)}$ após correção com o RNA normalizador endógeno S26.

Tabela 6 - Resultado por amostra da expressão dos mRNAs que codificam a leucotoxina do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e RNA polimerase da *Porphyromonas gingivalis*, a partir do RNA total de tecido placentário, por RT-PCRtr e respectivos resultados, Campo Grande- MS, 2014

Amostra (a)	Numeração equivalente Placenta PCRtr	Leucotoxina <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	RNA polimerase <i>Porphyromonas gingivalis</i>
01	14	N	D
02	15	D	N
03	#	#	#
04	16	N	N
05	17*	N	N
06	18	N	D
07	19	N	D
08	20	N	N
09	21*	D	D
10	22	#	#
11	23	D	D
12	#	#	#
13	26	N	D
14	27	N	D
15	28	N	D
16	29	D	D
17	30	N	D
18	31	N	D
19	32*	D	D
(n=19)	(n=19)	(n=16)	(n=16)
Total detectadas	-	05	12
Percentual (%)	-	31	75

(D) detectado, (N) não detectado e (#) não se aplica, amostra inviável neste processamento.

*indicação de amostras positivas no PCRtr para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

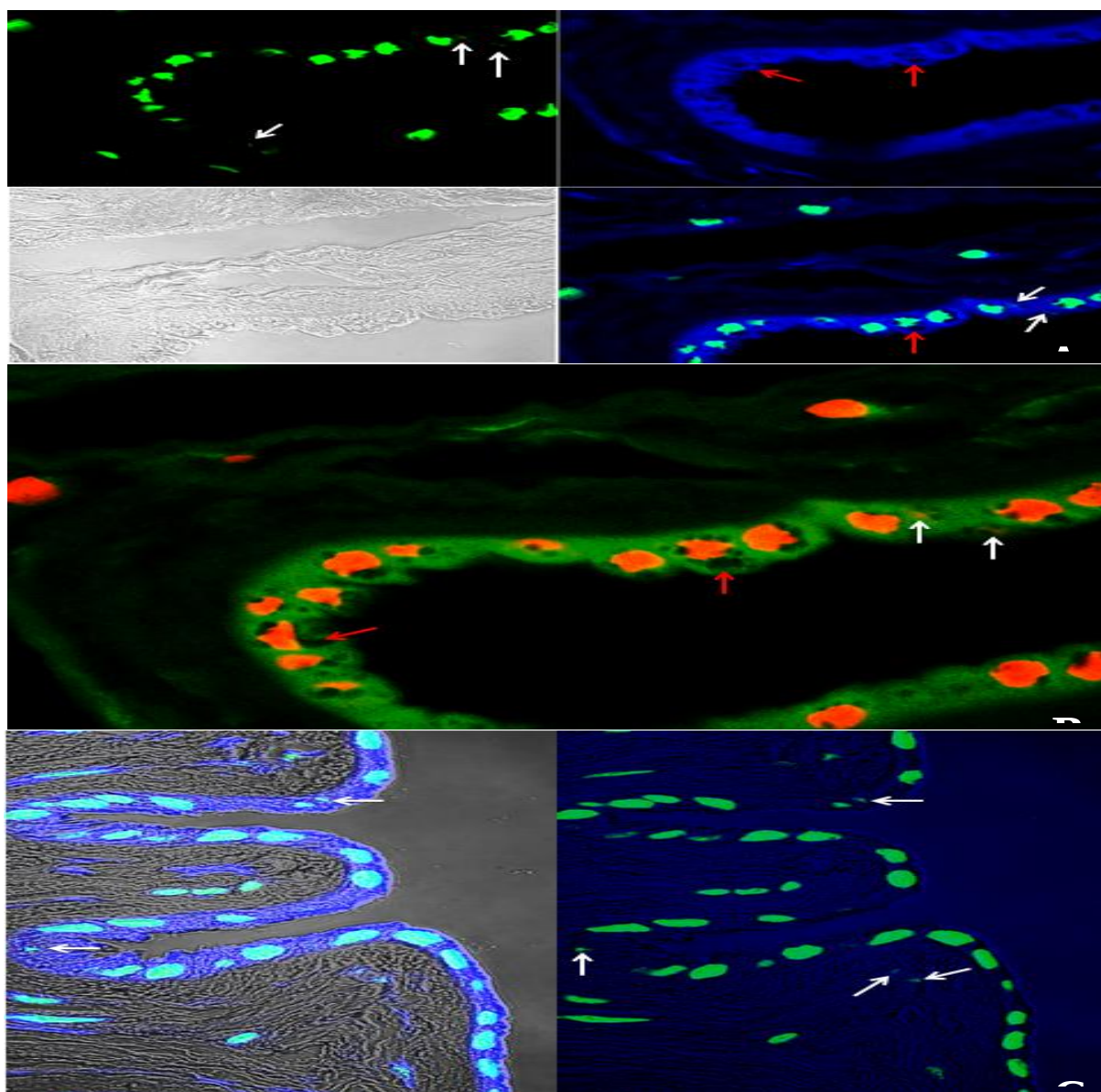


Figura 19 - Fotomicrografia confocal das vilosidades da placenta materna apresentando as células trofoblásticas e tecido conjuntivo. As setas vermelhas apresentam sinais de formação de vacúolo nas células trofoblásticas, significativas quanto à presença de bactérias. As setas brancas indicam a presença de material genético extra-nuclear sugestivo de *Porphyromonas gingivalis*. As células foram coradas com phalloidin green para actina (cores verde e azul). O material genético foi corado com DAPI (4-amidinofenil) -1H-indol-6-carboxamidina) e PI (Iodeto de Propídio) verde e vermelho.

6 DISCUSSÃO

O intuito do presente trabalho foi avaliar as relações de prematuridade e doença periodontal em face à sua importância médica e vasta literatura, sugestivas desta hipótese (OFFENBACHER *et al.*, 1996; JEFFCOAT *et al.*, 2001; DASANAYAKE, 1998; MITCHELL-LEWIS *et al.*, 2000; GLESSE *et al.*, 2004; INABA, AMANO, 2010; GONZALEZ-MARIN *et al.*, 2011; SHANTHI *et al.*, 2012). Realizou-se portanto, a detecção de DNA genômico por PCRtr de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a partir de biofilme de exsudato de sulco gengival materno, tecido placentário e sangue de cordão umbilical. Para confirmação e avaliação da presença e viabilidade bacteriana nas amostras positivas de placenta, estudos de RT-PCRtr para expressão dos mRNAs da RNA polimerase da *Porphyromonas gingivalis* e a leucotoxina do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a partir de RNA total foram adicionados, além da posterior avaliação destas amostras de tecido placentário PCRtr positivas por microscopia confocal.

Os debates desta temática partem da abordagem de mães, entre a 29ª e 36ª semana de gestação, destas 47,4%, não referiam doenças crônicas, e/ ou infecções no período gestacional, que ligassem a evidência da prematuridade. Mundialmente a literatura sinaliza um elenco de fatores de risco relacionados, porém é consensual que as causas que levam a prematuridade são multifatoriais e complexas (GRANVILLE-GARCIA *et al.*, 2012), o que está em concordância com o resultado obtido.

Conjecturou-se assim, nesta tese, a hipótese de uma possível relação doença periodontal e a prematuridade.

Por meio da avaliação clínica das mães, 100% destas apresentavam indicativos de doença periodontal. No presente estudo, a presença do sangramento e de cálculo foi avaliada como indicativo de gengivite, e a periodontite, foi avaliada pela presença da bolsa periodontal, ambas as condições como causa imediata de inflamação e classificadas como doença periodontal (GESSER; PERES; MARCENES, 2001).

A ocorrência na gravidez, segundo Moimaz *et al.* (2009) é frequente, e sinaliza um risco temporário aumentado para gestantes, apontando as deficiências nutricionais, estado transitório de imunodepressão, alterações hormonais e as condições locais de higiene, como fatores desencadeadores (ROSELL *et al.*, 1999; HONKALA *et al.*, 2010).

Há evidência neste grupo pesquisado, principalmente quanto às condições locais, que 50% das mães apresentaram sangramento gengival e 83,3% cálculo dental, estes são indícios de gengivite, ambas as condições são consideradas causa imediata de inflamação, tornando-se precedente de condições mais graves (GESSER; PERES; MARCENES, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2007; GONÇALVES, 2010).

Estas mães foram questionadas se apresentavam sangramento gengival, 36,8% tinham percepção da alteração, porém, no exame clínico realizado, 50% delas apresentavam o dado clinicamente. O sangramento é uma manifestação que pode ocorrer em gestantes (YALCIN *et al.*, 2002; MOIMAZ *et al.*, 2009) e acontecer em até 100% de mulheres grávidas (BASARAVAJU *et al.*, 2012).

O grande percentual de cálculo dental visível (83,3%) leva ao questionamento a respeito das condições locais de higiene destas mulheres, que podem potencializar a reação inflamatória local e concorrerem para a progressão da doença periodontal. O episódio é significativo, pois 78,9% destas mulheres afirmaram não terem sido abordadas pela equipe de saúde que as atendia, com qualquer informação de saúde bucal e 100% delas sinalizaram ter necessidade de cuidados odontológicos.

Sem a intervenção direta, seja informativa, educativa e/ou clínica espera-se a progressão da doença (MOIMAZ *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Neste grupo, 16,7% das mães, tinham bolsa periodontal, referência de periodontite, esta caracterizada pela migração do epitélio gengival, e consequente perda óssea (ALMEIDA *et al.*, 2006).

O comprometimento do peridonto está ligado ao acúmulo do biofilme dental, que consiste em uma comunidade microbiana inespecífica, mais de 500 espécies já foram identificadas, porém são poucas as que estão ligadas diretamente a doença periodontal (WILDERER; CHARAKLIS, 1989; ZANBON, 1996; HAFFAJE; SOCRANSKY, 1994; SOCRANSKY; HAFFAJE, 1998).

O *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* são micro-organismos vinculados à doença periodontal, e de atual interesse, considerando o volume de publicações nos continentes e o fato da doença periodontal ser de alta prevalência mundialmente (SILVA, 2008; NAVES *et al.*, 2009).

Os resultados deste estudo mostraram que todos os espécimes pesquisados foram viáveis para a detecção de DNA genômico dos micro-organismos investigados. Além da boca, foram coletados espécimes em outros dois sítios distantes da cavidade bucal. Detecção de micro-organismos em outros locais, que não a cavidade bucal, tem sido propostos,

considerando a afirmação de que infecções à distância têm sido indicadas como responsável 30 a 50% dos casos de prematuridade (BITTAR; ZUGAIB, 1993; SLOTS; KAMMA, 2001; PASSINI JUNIOR; NOMURA; POLITANO, 2007).

A PCRtr detectou *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, em aproximadamente 15% dos três espécimes, entretanto, as amostras de biofilme das mães apresentaram o maior percentual de 16,7%.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans tem sido frequentemente detectado no sulco gengival da população geral com periodontite agressiva, principalmente devido a expressão da leucotoxina, que tem capacidade de destruição específica de neutrófilos e macrófagos, atuando sobremaneira na resposta imune do hospedeiro (KACHLANY, 2010; GOULART *et al*, 2010; BRAGE; HOLMUND, JOHANSSON, 2011; CLAEISSON *et al.*, 2011; RASLAN *et al.*, 2011).

Estudos avaliando mães com parto pré-termo, encontraram taxas consideradas altas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, que variavam entre 45 a 57% no sulco gengival (MARINHO *et al.*, 2012), diferentes das identificadas neste trabalho. Existe indagação, neste caso, sobre quais fatores poderiam ter influenciado estes resultados nas gestantes, pois esta bactéria não tem sido encontrada em alta prevalência em populações com gengivite e periodontite leve a moderada, o que sugere uma maior investigação.

O *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* também mostrou baixos percentuais no sangue do cordão umbilical e placenta, como mencionado anteriormente. Outras pesquisas que consideraram este micro-organismo em sítio distante também tiveram resultados semelhantes (SWATI *et al.*, 2012).

A detecção, mesmo que reduzida, destas duas bactérias no sangue do cordão umbilical pode expressar um processo inflamatório, com possível exposição do feto, este evento é causa frequente de aborto, morte natal e neonatal, doença neonatal e parto prematuro. Daí a necessidade de métodos rápidos para diagnóstico de infecção, especialmente nos partos de prematuros. As vias ascendente e hematogênica são cogitadas neste tipo de ocorrência (GARCIA; AZOUBEL, 1986).

A prevalência de *Porphyromonas gingivalis* foi elevada nos espécimes estudados, com 100% no sangue de cordão umbilical, 95% no tecido de hilo placentário e 83% no biofilme de sulco gengival materno. Porém, quando buscamos as amostras da mesma mãe para sangue/placenta e biofilme, o dado torna-se ainda mais contundente, pois das 19 mães, 09 tinham a tríade completa (sangue, placenta e exsudato), e destas 08 apresentaram a

P.gingivalis nos diferentes espécimes, portanto sugerindo a relação mãe-bebê de forma bem característica, um dado novo, que sugere fortemente a via de translocação hematogênica.

A triagem por PCRtr de 64 amostras arquivadas de DNA genômico placentário, reforçou os achados de prevalência da *Porphyromonas gingivalis* demonstrando 32(50%) positivas e 2(3,1%) positivas para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em placentas de pacientes com suspeita de infecção pré-natal. Constatou-se, portanto, uma positividade expressiva de detecção da *Porphyromonas gingivalis* em relação ao *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, considerando os três espécimes estudados. A *Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria detectada com frequência em mulheres grávidas (BASARAVAJU et al., 2012)

Outros estudos também corroboram o achado, com este micro-organismo sendo identificado em locais distantes da boca. Swati et al. (2012) utilizaram amostras orais e de tecido placentário obtendo positividade das mesmas para estes micro-organismos, em sangue e placenta, independente do status da doença periodontal, e tiveram a *Porphyromonas gingivalis* como de maior expressão.

A presença da *Porphyromonas gingivalis* também já foi identificada no líquido amniótico de mulheres com parto prematuro com membranas íntegras (LEON et al., 2007) e em placentas de puérperas com desfecho reprodutivo ruim (BEARFIELD et al., 2002; HAN et al., 2006; BARAK et al., 2007; FEITOSA, 2011). Porém, o seu papel definitivo para o parto prematuro tem sido debatido. Katz et al. (2009), realizaram estudo que tinha como objetivo a busca de anticorpos específicos para a *Porphyromonas gingivalis*, tendo como conclusão que esta pode colonizar tecido placentário, e contribuir para o parto prematuro, porém o fato de ter sido estabelecido a reatividade de anticorpos do micro-organismo, não confirma a presença de bactérias inteiras, mas sim de seus antígenos.

As bacteremias concorreriam para este desfecho, pois estas são frequentes e recorrentes com *Porphyromonas gingivalis* e outros patógenos orais em pessoas com doença periodontal, durante o próprio processo de mastigar (LOESCHE, 1997; MC NICOL; ISRAELS, 2010), fato que levaria a conjectura do trânsito desta bactéria à placenta, pela via de disseminação hematogênica. A principal função da placenta seria a de barreira física, adiando, mais do que impedindo a passagem de patógenos ao produto da concepção (GARCIA; AZOUBEL, 1986).

A invasão do tecido placentário, está relacionada aos expressivos fatores de virulência da bactéria, causando perturbação da homeostase dos tecidos placentários (KATZ

et al., 2009), desregulamentação das respostas imunes, por meio da interrupção da expressão das citocinas e aumento da proliferação celular, suprimindo a apoptose (MAO *et al.*, 2007), ocorreria também ação dos lipopolissacarídeos e desencadeamento da síntese de PGE2 e TNF- α pelas células corioamnióticas e posterior indução do parto pré-termo. (DANTAS *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2006; MACHIAVELLI; PIO, 2008; ENGBRETSON; LALLA; LAMSTER, 2000; SERT *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2013).

A detecção dos periodontopatógenos por meio de um *screening* que envolvia 64 placentas com sinais de infecção neonatal e prematuridade também foi realizada nesta pesquisa. Os resultados seguiram a tendência já delineada anteriormente, com a *Porphyromonas gingivalis* apresentando positividade em 50% das amostras e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 3,1%.

Neste grupo em que foi realizado o *screening*, o quadro de infecção neonatal era característico para patógenos de origem diferente da bucal, como exemplo a *Escherichia coli*, entre outras. O nosso resultado mostrou a *Porphyromonas gingivalis* conjuntamente, achado que evidencia a capacidade de permanência e adaptação da *Porphyromonas gingivalis* com outros micro-organismos em tecido placentário. É sabido que as espécies microbianas interagem e podem influenciar o processo das doenças, favorecendo seu crescimento ou aumentando o potencial de virulência de outros micro-organismos (LINDHE, 1999).

A capacidade de suportar o *stress* oxidativo, que é submetido o micro-organismo, também é outro fator a ser considerado para caracterizar a singularidade da *Porphyromonas gingivalis*, esta apresenta tal propriedade, que certamente facilita sua resposta na adaptação e consiste em um importante fator de virulência desta bactéria (MYZAC *et al.*, 2014).

O genótipo bacteriano e carga, os fatores genéticos e a fisiologia do hospedeiro são cogitados atualmente como de interesse de estudo para explicar a colonização da *Porphyromonas gingivalis* na placenta (Katz *et al.*, 2009).

A RT-PCRtr de RNA total de placentas avaliadas, apresentou Leucotoxina da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em 5 (31%) amostras, e 12 (75%) apresentaram a expressão de RNA polimerase específica da *Porphyromonas gingivalis*. Estes achados mostram que nas placentas PCRtr positivas existe uma grande porcentagem de bactérias viáveis expressando proteínas relevantes para sua proliferação. Os dados de microscopia confocal reforçaram estes achados, sugerindo a presença de material genético bacteriano pela consistente formação de vacúolos significativos de bactérias e material genético extra-nuclear.

Mysac et al., 2014 abordou especificamente a *Porphyromonas gingivalis*, esclarecendo que esta adere à célula hospedeira, internalizando-se pela membrana (*rafts* lipídicos), incorporando-se por intermédio dos primeiros fagossomos, ativando a autofagia celular para fornecimento de um ambiente favorável a replicação, enquanto suprime a apoptose. O vacúolo replicante contém as proteínas da célula hospedeira que foi adquirida por autofagia, contribuindo para o mecanismo de sobrevivência do patógeno.

Pela primeira vez apresentamos aqui a expressão dos mRNAs que codificam a leucotoxina do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e RNA polimerase da *Porphyromonas gingivalis*, a partir do RNA total em tecido placentário, já que não detectamos estudos na literatura que tenham identificado a expressão destes componentes na placenta. A nossa propositiva aqui se consolida, sugerindo a metodologia aplicada, para futuros estudos de viabilidade do micro-organismo associadas à técnica de microscopia confocal para estabelecer o diagnóstico funcional. Este levou à constatação de que houve atividade das duas bactérias na placenta, com maior detecção da *Porphyromonas gingivalis*. Este dado é de potencial importância, pois a presença da *Porphyromonas gingivalis* no sangue, placenta e sulco, e expressão funcional no mesmo grupo de mães, evidenciam que o micro-organismo que é de origem bucal, teve a capacidade de translocar para a placenta e sangue e ainda expressar proteínas potenciais para sua proliferação, sugerindo a relação da doença periodontal e prematuridade.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Em conclusão:

- a) Os resultados obtidos das diferentes metodologias aplicadas nos espécimes avaliados, sugerem uma importante relação de prematuridade com doença periodontal materna;
- b) A maior detecção da *Porphyromonas gingivalis* em todos os espécimes (sangue, placenta e sulco) e sua expressão funcional no mesmo grupo de mães e a origem bucal do micro-organismo, reforçam a teoria da infecção a distância e a via hematogênica de translocação do patógeno;
- c) O diagnóstico funcional apresentado a partir da expressão dos mRNAs que codificam a RNA polimerase da *Porphyromonas gingivalis* e a leucotoxina do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a partir do RNA total em tecido placentário, mostrou-se eficaz no sentido de constatar a atividade dos micro-organismos na placenta;
- d) A utilização da metodologia apresentada para estudos de viabilidade do micro-organismo associadas à técnica de microscopia confocal para diagnóstico funcional mostrou-se alternativa viável e inovadora;

CONSIDERAÇÕES FINAIS

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, na própria concepção, aborda a promoção da saúde, a pesquisa interdisciplinar e problemas críticos na área da saúde da região centro-oeste.

Nesta linha, abordamos aqui um tema que tem implicações mundiais, porém em nível local o problema também está presente.

Este é um fato vivenciado por esta pesquisadora, servidora da Secretaria Municipal de Saúde de Campo Grande - MS, antes da propositiva desta tese, quando participava de amplos debates da equipe técnica da atenção básica sobre os indicadores de saúde e a avaliação dos procedimentos da rede municipal no setor da odontologia para gestantes. Questionava-se o pré-natal, a integração de seus profissionais e a adesão desta mulher ao tratamento odontológico e os próprios dados referentes a prematuridade.

Os dados atuais são importantes. Como exemplo, cita-se 1400 nascimentos prematuros em 2013 e até o primeiro semestre de 2014, o registro de 743 nascimentos, estes ocorreram em mulheres com até 36 semanas de gestação. Os óbitos também são registrados e em 2013, o percentual foi de 5,5% e em 2014 este percentual já no primeiro semestre atinge 3,7% dos nascidos vivos prematuros (SESAU, 2014). As condições deste nascimento são especiais e as complicações trazidas para a saúde da mulher e da criança são importantes, além de apresentar repercussões sociais, econômicas e financeiras e de gestão, pois interfere diretamente no custo de internações, leitos de unidade de terapia intensiva, medicamentos, recursos humanos especializados, entre outros.

Sendo assim, em que esta tese aborde como principal o problema de forma clínica e laboratorial envolvendo a biologia molecular, e neste ponto estamos convictos no êxito, face à descoberta inédita de interesse nos seus resultados, o que deve estimular a comunidade acadêmica a evolução para novas pesquisas clínicas.

Por outro lado, também minutamos que este tem elementos para uma profunda reflexão da prática clínica médica e odontológica e porque não ousar para todas as que estão ligadas ao assunto, no verdadeiro enfoque multiprofissional e interdisciplinar. Além disso, há um convite implícito para a gestão de serviços, na proposição da atenção a saúde das gestantes na área de odontologia.

REFERÊNCIAS

Africa CW, Kayitenkore J, Bayingana C. Examination of maternal gingival crevicular fluid for the presence of selected periodontopathogens implicated in the pre-term delivery of low birthweight infants. *Virulence*. 2010. Jul-Aug; 1(4):254-9. PMID: 21178450 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Ali TB, Abidin KZ. Relationship of periodontal disease to pre-term low birth weight infants in a selected population - a prospective study. *Community Dent Health*. 2012. Mar; 29(1):100-5. PMID: 22482259 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Almeida RF, Pinho MM, Lima C, Faria I, Santos P, Bordalo C. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. *Revista Port Clin Geral*, v.22, 2006, 379-390.

Alves RT, Ribeiro RA, Costa LRRS. Associação entre doença periodontal em gestantes e nascimentos prematuros e/ou baixo peso: um estudo de revisão. *HU Rev*; 2007 3(1):29-36.

Amano A. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *Jounal of Periodontology*. 2003; 74(1):90-96. [PubMed].

Ando ES, De-Gennaro LA, Faveri M, Feres M, Dirienzo JM, Mayer MP.. Immune response to cytolethal distending toxin of *Agregatibacter actinomycetemcomitans* in periodontitis patients. *J Periodontal Res*. 2010 Aug; 45(4):471-80. doi: 10.1111/j.1600-0765.2009.01260.x. Epub 2010 Mar 9 PMID:20337882. [PubMed - indexed for MEDLINE] PMCID:PMC3534802.

Araújo FRG, Kelner N, Soares RPF, Jovino RS. Relação entre a doença periodontal e partos prematuros e bebês de baixo peso. *Periodontia*. 16(3) ;61-66, set, 2006.

Ávila WS, Timerman L, Romito GA, Marcelino SL, Neves IL, Zugaib M, Grinberg M. Periodontal disease in pregnant patients with rheumatic valvular disease: clinical and microbiological study. Arq Bras Cardiol. 2011 Apr; 96(4):307-11. Epub 2011 Apr 1. English, Portuguese, Spanish.PMID:21468535 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Bainbridge B, Verma RK, Keastman C, Yehia B, Rivera M, Moffatt C, Bhattacharyya I, Lamont RJ, Kesavalu L. Role of *Porphyromonas gingivalis* phosphoserine phosphatase enzyme SerB in inflammation, immune response, and induction of alveolar bone resorption in rats. Infect Immun. 2010 Nov, 78 (11):4560-9. doi: 10.1128/IAI.00703-10. Epub 2010 Aug 30. PMID:20805334 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Barak S, Oettinger-Barak O, Matchtei EE, Sprecher H, Ohel G. Evidence of periodopathogenic microorganisms in placentas of women with preeclampsia. J Periodontal. 2007, 78:670-676 [PubMed].

Basavaraju A, Durga S V, Vanitha B. Variations in the Oral Anaerobic Microbial Flora in Relation to Pregnancy. J Clin Diagn Res. Nov 2012; 6(9): 1489–1491.doi: 10.7860/JCDR/2012/4609.2540. PMCID: PMC352777.

Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid microorganism infection and microflora in the mouth. BJOG 2002;109:527-33.

Bedran TBL, Nogueira NM, Spolidorio LC, Estrela C, Spolidorio DM. Patógenos periodontais: Comparação entre cultura bacteriana e PCR em tempo real para teste diagnóstico. Rev Odontol Bras Central, 2010, 19(50). p187-191.

Bittar R, Zugaib M. Prematuridade: aspectos obstétricos. In: Assistência à gestante de alto risco e do recém-nascido nas primeiras horas. Costa Vaz FAC. São Paulo: Atheneu; 1993. p.39-35.

Boisvert H, Duncan MJ. Translocation of *Porphyromonas gingivalis* gingipain adhesin peptide A44 to host mitochondria prevents apoptosis. *Infect Immun*. 2010 Aug;78(8):3616-24. doi: 10.1128/IAI.00187-10. Epub 2010 Jun 14. PMID:20547744 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Boutin A, Demers S, Roberge S, Roy-Morency A, Chandad F, Bujold E. Treatment of Periodontal Disease and Prevention of Preterm Birth: Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Perinatol*. 2012, Dec 27. PMID: 23271387 [PubMed – in process].

Brage M, Holmlund A, Johansson A. Humoral immune response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. *J Periodontal Res*. 2011 Apr;46(2):170-5. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01325.x. Epub 2010. Dec 1. PMID: 21118415. [PubMed - indexed for MEDLINE].

Brunner J, Wittink Fr, Jonker MJ, de Jong M, Breit Tm, Laine MI, De Soet JJ, Crielaard W. The core genome of the anaerobic oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol*. 2010 Sep 29;10:252. doi: 10.1186/1471-2180-10-252. MID:20920246[PubMed - indexed for MEDLINE].

Carvalho R, Martins AS, Oliveira AM, Gouvea AMG, Passos LMF. Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction. *Archives of Virology*, v. 145, n.9, p. 1773-1787, 2000.

Cassini MA, Pilloni A, Condo SG, Vitali LA, Pasquantonio G, Cerroni L. Periodontal bacteria in the genital tract: are they related to adverse pregnancy outcome? *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013 Oct-Dec;26 (4):931-9. PMID:24355228 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Chakki BA, Ealla Kr, Hunsingi P, Kumar A. Influence of maternal periodontal disease as a risk factor for low birth weight infants in Indian population. *J Contemp Dent Pract*. 2012. Sep 1;13 (5):676-80. PMID: 23250174. [PubMed - indexed for MEDLINE].

Claesson R, Lagervall M, Höglund-Aberg C, Johansson A, Haubek D. Detection of the highly leucotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in members of a Caucasian family living in Sweden...*J Clin Periodontol*. 2011. Feb; 38 (2):115-21. doi:

10.1111/j.1600-051X.2010.01643.x. Epub 2010 Nov 14. PMID: 21073494 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Colins JG, Winley HW, Arnold RR, Offenbacher S. Effects of a *Porphyromonas gingivalis* infection on inflammatory mediator response and pregnancy outcome in hamsters. *Infect Immun*, 1994;62:4356-4361.

Cortelli Jr, Roman-Torres CV, Aquino DR, Franco GC, Costa FO, Cortelli SC. Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Brazilians with chronic periodontitis. *Braz Oral Res*. 2010 Apr-Jun;24(2):217-23. PMID:20658042[PubMed - indexed for MEDLINE].

D'Espiro TTS. Estrutura populacional, características fenotípicas e variabilidade do locus de síntese de polissacarídeo capsular de *Porphyromonas gingivalis*. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo, 2011. 78f.

Dantas EM, Nóbrega FJO, Dantas PMC, Menezespra, Gaspar Jr AA, Leite EB. Doença Periodontal como fator de risco para complicações na gravidez-há evidência científica? *Odontologia, Clin.-Cientif., Recife*, 3(1):07-10, jan./abr., 2004.

Dasanayake AP. Poor periodontal health of the pregnant woman as a risk factor for low birth weight. *Ann Periodontol* 1998; 3:206-12.

Dashper SG, Pan Y, Veith PD, Chen YY, Toh EC, Liu S W, Cross KJ, Reynolds EC. Lactoferrin inhibits *Porphyromonas gingivalis* proteinases and has sustained biofilm inhibitory activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar;56(3):1548-56. doi: 10.1128/AAC.05100-11. Epub 2012 Jan 3. PMID:22214780[PubMed - indexed for MEDLINE].

Davenport ES, Williams CECS, Stern JAC, Murad S, Sivapathasundram V, Curtis MA. Maternal periodontal disease and preterm low birth weight: case control study. *J Dent Res* 2002; 81:313-8.

Destefano F, Anda RF, Kahn HS, Williamson DF, Russelcm. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *Mar* 13:306 (6879):688-91.

Doğan B, Kipalev, Okte E, Sultan N, Asikainen S. E. Consistent intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* despite clonal diversity. J Periodontol. 2008 Feb;79(2):307-15. doi: 10.1902/jop.2008.070270 . PMID:18251645[PubMed - indexed for MEDLINE].

Ebersole JL, Cappelli D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. Periodontology 2000 2000; 23:19-49.

Engbretson SP, Lalla E, Lamster IB. Subgingival microbiota and preterm low birthweight. J Dent Res 2000; 79(3711):607.

Feitosa ACR. Avaliação Clínica e microbiológica em puerpéras com doença periodontal e a sua relação com desfecho produtivo ruim. [Tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2011.

Fonseca ESB, Bittar RE, Zugaib M. Prevenção do Nascimento Prematuro: Importância da Monitorização das Contrações Uterinas. Rev. Bras. Ginecol. Obstet., Rio de Janeiro, v. 21, n. 9, out. 1999 .

Gaetti-Jardim E Jr, Wahasugui Tc, Tomazinho PH, Marques M M, Nakano V, Avila-Campos Mj. Distribution of biotypes and leukotoxic activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from Brazilian patients with chronic periodontitis. Braz J Microbiol. 2008 Oct;39 (4):658-63. doi: 10.1590/S1517-838220080004000011. Epub 2008 Dec 1.PMID:24031284 [PubMed].

Garcia, A; Azoubel, R. A placenta humana. Editora Parma. Rio de Janeiro. 1986. 205p.

Gasparetto A, Arana-Chavez VE, Avila-Campos MJ. Aderência de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* às células epiteliais bucais: estabilidade e aspectos ultra-estruturais. *Pesqui. Odontol. Bras.* [online]. 2000, vol.14, n.4, pp. 311-318. ISSN 1517-7491. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-74912000000400002>.

Gesse HC, Peres MA, Marcenes W. Condições gengivais periodontais associadas a fatores socioeconômicos. Rev.saude publica. 2001;35:289-93.

Ghizoni JS. Identificação de bactérias periodontopatogênicas em placas ateromatosas da carótida humana. Tese [doutorado]. Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São paulo. 2012. 105p.

Glesse, S; Mantesso, A; Ramalho, AS; Simoni, JL; Saba-Chujfi, E. Influência da doença periodontal no parto pré-termo. RGO, 52(5), Nov/dez, 2004.

Gonçalves ELM. A importância da prevenção e da intervenção em doença periodontal pela equipe de saúde da família. Uberlândia. 2010. 35p. trabalho de conclusão de curso (Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família). Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

Gonzales-Marin C, Spratt DA, Millar MR, Simmonds M, Kempley ST, Allaker RP. Levels of periodontal pathogens in neonatal gastric aspirates and possible maternal sites of origin. *Oral Microbiol.* 2011 Oct;26(5):277-90. doi: 10.1111/j.2041-1014.2011.00616.x. Epub 2011 Jun 13. PMID:21896155 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Goulart AL. Caracterização da população neonatal. In: Kopelman, BI; Santos, A.M.N.; Goulart, A.L.; Almeida, M.F.B.; Miyoshi, M.H.; Guinsburg, R. Diagnóstico e tratamento em neonatologia. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. Cap. 01.

Goulart RC, Bolean M, Paulino TP, Thedei G Jr, Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg.* 2010 Aug;28 Suppl 1:S53-60. doi: 10.1089/pho.2009.2591. PMID:19780630 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Granvile-Garcia AF, Lins RDAU, Oliveira ACB, Paiva SM, Sousa RV, Martins V, Silva MSP, Ferreira JMS, Menezes VA. Fatores associados ao desmame precoce em Hospital Amigo da Criança. *Rev Odonto Cienc* 2012;27(3):202-207

Grenier D, La VD. Proteases of *Porphyromonas gingivalis* as important virulence factors in periodontal disease and potential targets for plant-derived compounds: a review article. *Curr*

Drug Targets. 2011 Mar 1;12 (3):322-31. Review PMID:20955149 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Grigoriadou ME, Koutayas SO, Madianos PN, Strub JR. Interleukin-1 as a genetic marker for periodontitis: review of the literature. Quintessence Int. 2010 Jun;41(6):517-25. PMID:20490394 PubMed - indexed for MEDLINE].

Grinberg, J. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. Nucleic Acids research, v.17,n.20,p.83-90,1989.

Groeger S, Doman E, Chakraborty T, Meyle J. Effects of *Porphyromonas gingivalis* infection on human gingival epithelial barrier function in vitro. Eur J Oral Sci. 2010 Dec;118 6):582-9. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00782.x. Epub 2010 Oct 14. PMID:21083619 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Grupo de Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico. PCR - Amplificação de DNA in vitro Básico. Fundamentos da Técnica de PCR. Publicado em 24/11/2005 . Acesso eletrônico: <http://col115w.col115.mail.live.com/mail/PrintShell.aspx?type=message&cpids=9ad58640-b6ae-11d>. Acesso em 12/10/2009.

Guimarães ZL, Moimaz SAS, Saliba NA, Garbin CAS. Periodontite materna e parto prematuro: aspectos biológicos, epidemiológicos e preventivos. Periodontia;15 (3):10-13,jul.-set,2005.

Ha JE OH KJ, Yang HJ, Jun JK, Jin BH, Paik DI, Bae KH. Oral health behaviors, periodontal disease, and pathogens in preeclampsia: a case-control study in Korea. J Periodontol. 2011 Dec;82(12):1685-92. doi: 10.1902/jop.2011.110035. Epub 2011 Apr 12. PMID:21486182. [PubMed - indexed for MEDLINE.

Haffaje AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. J Clin Periodontol, v.25, p.346-353, 1998.

Haffaje AD; Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol2000 1994;5:78-11.

Han YH, Ikegami A; Bissada NF; Herbst M, Redline RW; Ashmead GG. Transmission of an uncultivated *Bergeyella* strain from the oral cavity to amniotic fluid in a case of preterm birth. J clin Microbiol. 2006; 44: 1475-83.

Hasegawa-Nakamura K, Tateishi F, Nakamura T, Nakajima Y, Kawamata K, DOuCHI T, Hatae M, Noguchi K.. The possible mechanism of preterm birth associated with periodontopathic *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res. 2011 Aug;46(4):497-504. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01366.x. Epub 2011 Apr 13.PMID:21488875 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Honkala S, Al-Ansari J. Self-reported oral health, oral hygiene habits, and dental attendance of pregnant women in Kuwait. J Clin periodontal. V.32, n.7:p.809-14, 2005.

Hunter W. Oral sepsis as a cause of disease. The British Medical Journal. July 28, 1910.

Inaba H, Amano A. Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases--from molecular mechanisms to clinical cases: Implication of periodontal diseases in development of systemic diseases.J Pharmacol Sci. 2010;113(2):103-9. Epub 2010 May 24. Review.PMID:20501966[PubMed - indexed for MEDLINE].

Jeffcoat MK, Hauth JC, Geurs NC, Reddy MS, Cliver SP, Hodgkins PM, Goldenberg RL. Periodontal infection and preterm birth: results of a prospective study. J Am Dent Assoc, 2001; 32:875-80.

Johansson, A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: a powerful tool with capacity to cause imbalance in the host inflammatory response. Toxins (Basel). Mar,2011;3(3):242-259.

Kachalany SC. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. J Dent Res. 2010.Jun;89 (6): 561-570. PMID: 20200418 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Katz J, Chegini N, Shiverick KT, Lamont, RJ. Localization of *P gingivalis* in Preterm Delivery Placenta. J Dent Res. Jun 2009; 88(6): 575–578. doi: 10.1177/0022034509338032. PMCID: PMC3144059.

Kolodrubetz D, Dailey T, Ebersole J, Kraig E. Cloning and Expression of the Leukotoxin Gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. INFECTION AND IMMUNITY, May, p. 1465-1469. 1989.

Konopka T, Paradowska-Stolarz A. Periodontitis and risk of preterm birth and low birthweight--a meta-analysis. Ginekol Pol. 2012 Jun; 83 (6). PMID: 22880465 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Lawn JE, Gravett MG, Nunes TM, Rubens CE, Stanton C. Global report on preterm birth and stillbirth (1 of 7): definitions, description of the burden and opportunities to improve data. BMC Pregnancy Childbirth. 2010;10 (Suppl 1):S1. DOI:10.1186/1471-2393-10-S1S

Ledder RG, Gilbert P, Huws SA, Aarons L, Ashley MP, Hull PS, . McBain AJ. Molecular Analysis of the Subgingival Microbiota in Health and Disease. Appl Environ Microbiol. Jan 2007; 73(2): 516–523. Published online Nov 3, 2006. doi: 10.1128/AEM.01419-06. PMCID: PMC1796972

Leon R, Silva N, Ovalle A, Chaparro A, Ahumada A, Gajardo M et al. Detection of porphyromonas gingivalis in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. J periodontal. 2007; 78:1249-255.

Li Y, Shibata Y, Zhang L, Kuboyama N, Abiko Y. Periodontal pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS induces mitochondria dependent-apoptosis in human placental trophoblasts. Placenta. 2011 Jan;32(1):11-9. doi: 10.1016/j.placenta.2010.10.007. Epub 2010 Nov 13. PMID: 21074850[PubMed - indexed for MEDLINE].

Lindhe J. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 3 ed. Rio de janeiro: Guanabara Kogan, 1999cap. 4, p 92-126.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

Loesche WJ. Bacterial mediators in periodontal disease. Clin Infect Dis. 1993; 16:4 (Suppl): S203-10.

Louro, PM; Fiori, HH; Louro Filho, P; Steibel, J; Fiori, R. Doença periodontal na gravidez e baixo peso ao nascer. *Jornal de Pediatria*, v.77, n.1, 2001.

Machiavelli JL; PIO G. Medicina periodontal: uma revisão da literatura. *Odontologia Clin.Científ, Recife*, 7 (1):19-23, jan/mar., 2008.

Marinho, EVS, Santos, MPM, Regueira, L, Gomes Filho MA, Jamelli SR, Cimões R. Avaliação periodontal clínica e microbiológica em mães de prematuros: estudo caso-controle. *Pesq. Bras. Odontoped Clin Integr, João pessoa*, 12 (4):465-71, out./dez, 2012.

Mao S, Park Y, Hasegawa Y, Tribble GD, James CE, Handfield M, et al. Intrinsic apoptotic pathways of gingival epithelial cells modulated by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbio* 19:199, 2007 [PubMed]

Mayer MP, Bueno LC, Hansen Ej, Dirienzo Jm. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 1999.Mar;67(3):1227-37. PMID:10024565. [PubMed - indexed for MEDLINE].

MC Nicol A, Israels SJ. Mechanisms of oral bacteria-induced platelet activation. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010 May;88 (5):510-24. doi: 10.1139/y10-029. Review. PMID:20555421 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Melo WA, Carvalho MDB. Análise multivariada dos fatores de riscos para prematuridade no sul do Brasil. *Revista Eletrônica Gestão&Saúde*. Vol 5, n.2, 2014.p.398-09.

Meuric V, Rouillon M V, Chandad F, Bonnaure-Mallet M. Putative respiratory chain of *Porphyromonas gingivalis*. *Future Microbiology*. 2010, may; 5(5), 717-34. PMID: 20441545 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Miglioli AMD. PCR multiplex para o diagnóstico de *Streptococcus* e *Escherichia coli* no sangue do cordão umbilical e placenta na hipótese de infecção neonatal. Dissertação [Mestrado], Universidade Federal do mato Grosso do Sul. Campo Grande. MS.146p. 2003

Miglioli AMD. DNA genômico de *Streptococcus* e *Escherichia Coli* em sangue e aspirado traqueal e gástrico de recém nascidos intubados imediatamente após o nascimento. Tese [Doutorado]. UFMS, CCBS, 81p. 2009.

Mitchell-Lewis DA, Papapanou PN, Engebretson S. Periodontal intervention decrease the risk of preterm low birth weight. J Dent Res 2000; 79 (3712):607.

Moimaz SAS, Garbin CAS, Saliba NA, Ziwa LG. Condição periodontal durante a gestação em um grupo de mulheres brasileiras. Cienc Odontol Bras, 2006. Out./dez 9 (4);59-66.

Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-MI Y, Bartova J, Janatova T, Prochazkova J, Duskova J. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. Journal of Immunology Research, vol. 2014, Article ID 476068, 8 pages, 2014. doi:10.1155/2014/476068

Nascimento S, Suarez ER, Pinhal MA. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. Revista Brasileira Médica. V.67. Nov, 2010. Especial Oncologia.

Naves RC, Novaes VN, Sadigursky LM, Viana AMV. Doença periodontal em mães com parto prematuro/recém-nascidos com baixo peso:estudo piloto. Innov Implant J Biomater Esthet, São paulo, v.4,n.3, p.40-45, set./dez 2009.

Offenbacher S, Jared HL, O'Reilley PG, Wels SR, Salvi GE, Lawrence HP. Potencial pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. Ann Periodontol, 1998; Jul;3(1)233-250.

Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, ;Maynor G, Mckaig R, Bec J. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. Journal of Periodontology, 1996, v.67, p. 1103-1113.

Offenbacher S. Maternal periodontal infections, prematurity, and growth restriction. Clin Obstet Gynecol. 2004 Dec;47 (4):808-21; discussion 881-2. Review.

Okada Y, Hamadan, KIM Y, Takahashi Y, Asaguri K, Ozono, S, Sato S. Blockade of sympathetic beta-receptors inhibits Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in an experimental rat periodontitis model. Arch Oral Biol. 2010. PMID:20593554 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Oliveira AM, Oliveira PA, Cota LO, Magalhães CS, Moreira NA, Costa FO. Periodontal therapy and risk for adverse pregnancy outcomes. Clin Oral Investig. 2012 Oct;15 (5):609-15. doi: 10.1007/s00784-010-0424-8. Epub 2010 May 22. PMID: 20495936 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Oliveira GJPL, Fontanari AL, Souza JAC, Costa MR, Cirelli JA. Effect of periodontal treatment on the incidence of preterm delivery: a systematic review. Minerva Stomatol. 2010 Oct;59(10):543-50. PMID: 21048546. [PubMed - indexed for MEDLINE].

Ovalle A, Gamonal J, Martinez MA, Silva N, Kakarieka E, Fuentes A, Chaparro A, Gajardo M, Leon R, Ahumada A, Cisternas C. Relación entre enfermedad periodontal, infección bacteriana ascendente y patología placentaria com parto prematuro. Rev Méd Chile, 2009;137:504-14.

Passini Jr R, Nomura ML, Politano GT. Doença Periodontal e complicações obstétricas: há relação de risco? Rev. Bras. Ginec. Obst., 2007, 29(7); 372-7.

Pereira SAS. Periodontite crônica, trabalho de parto e parto pré-termo em gestantes brasileiras. Campinas, SP: 2006. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 414p. PMID:15596935 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Polyzos NP, Polyzos IP, Zavos A, Valachis A, Mauri D, Papanikolaou EG, Tzioras S, Weber D, Messinis IE. Obstetric outcomes after treatment of periodontal disease during pregnancy: systematic review and meta-analysis. BMJ. 2010 Dec 29;341: c7017. doi: 10.1136/bmj.c7017. Review. PMID:21190966 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Rades E, Bittar RE, Zugaib M. Determinantes diretos do parto prematuro eletivo e os resultados neonatais. Rev. Bras. Ginecol. Obstet., Rio de Janeiro, v. 26, n. 8, set. 2004.

Raslan S, Alencar CO, Cortelli JR, Cortelli SC, Aquino DR. Presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em associação com *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* em pacientes periodontais. Rev Odontol UNESP. 2011; 40(6): 304-309.

Ribeiro CM. Relação entre doença periodontal em gestantes com parto prematuro e o nascimento de bebês de baixo peso. Revista Saúde e Desenvolvimento, v.4,n.2, jul-dez, 2013.

Röhner E, Detert J, Kolar P, Hocke A, N'guessan P, Matziolis G, Kanitz V, Bernimoulin JP, Kielbassa A, Burmester GR, Buttgerit F, Pischon N. Induced apoptosis of chondrocytes by *Porphyromonas gingivalis* as a possible pathway for cartilage loss in rheumatoid arthritis. Calcif Tissue Int. 2010 Oct;87(4):333-40. Epub 2010 Jun 26. PMID: 20582408 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Roman-Torres CVG, Aquino DR, Cortelli SC, Franco GCN, Santos JG, Corraini P, Holzhausen M, Diniz MG, Gomez RS, Cortelli JR. Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis Brazilian subjects. Archives of oral biology .55(2010), 242-248.

Roncalli AG, Silva NN, Nascimento AC, Freitas CHSM, Casotti E, Peres KG et al . Aspectos metodológicos do Projeto SBBrasil 2010 de interesse para inquéritos nacionais de saúde. Cad. Saúde Pública [serial on the Internet]. 2012 [cited 2014 Sep 18] ; 28(Suppl): s40-s57. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2012001300006&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2012001300006>.

Rosa MI, Pires PD, Medeiros LR, Edelweiss MI, Martínez-Mes J. Periodontal disease treatment and risk of preterm birth: a systematic review and meta-analysis. Cad Saude Publica. 2012 Oct;28(10):1823-33. PMID:23090163 [PubMed - indexed for MEDLINE] .

Rosell FL, Montandon-Pompeu AAB, Valsecki JRA. Periodontal screening and recording in pregnant. Rev Saude Pública. V.33,n.2,p.157-62, abril, 1999.

Sakellari D, Katsikari A, Slini T, Ioannidis I, Konstantinidis A, Arsenakis M. Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the JP2 clone in a Greek population. J Clin Periodontol. 2011 Feb;38(2):108-14. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01649.x. Epub 2010 Nov 24. PMID:21092055 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Santos RS, Araujo APQC, Porto MAS. Diagnóstico precoce de anormalidades no desenvolvimento em prematuros: instrumentos de avaliação. J. Pediatr. (Rio J.), Porto Alegre, v. 84, n. 4, ago. 2008.

Sert T, kirzioğlu FY, Fentoğlu O, Aylak F, Mungan T. Serum placental growth factor, vascular endothelial growth factor, soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2 levels in periodontal disease, and adverse pregnancy outcomes. J Periodontol. 2011 Dec;82(12):1735-48. doi: 10.1902/jop.2011.100740. PMID: 21513467 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Sesau. Secretaria Municipal de Saúde Pública de Campo Grande. Diretoria de Vigilância em Saúde. Estatística de Nascimento em Prematuros de mães residentes em Campo Grande, MS. 2014.

Shaik-Dasthagirisahab YB, Kantarci A, Gibson FC . Immune response of macrophages from young and aged mice to the oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis*. Immun Ageing. 2010 Nov 29;7:15. PMID: 21114831[PubMed - indexed for MEDLINE].

Shanthi V, Vanka A, Bhambal A, Saxena V, Saxena S, Kumar SS. Association of pregnant women periodontal status to preterm and low-birth weight babies: A systematic and evidence-based review. Dent Res J (Isfahan). 2012 Jul;9(4):368-80. PMID: 23162575[PubMed - indexed for MEDLINE].

Shoji M, Yoshimura A, Yoshioka H, Takade A, Takuma Y, Yukitake H, Naito M, Hara Y, Yoshida S, Nakayama K. Recombinant *Porphyromonas gingivalis* FimA preproprotein expressed in *Escherichia coli* is lipidated and the mature or processed recombinant FimA protein forms a short filament in vitro. Can J Microbiol. 2010 Nov;56(11):959-67. doi: 10.1139/w10-084. Erratum in: Can J Microbiol. 2011 Jan;57(1):68. PMID:21076487[PubMed - indexed for MEDLINE].

Silva RF. Doença periodontal é fator de risco para parto premature e baixo peso ao nascer? Revisão Sistemática. Rio de Janeiro. 2008. 39p. Dissertação [mestrado]. Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.

Silveira MF, Matijasevich A, Horta BL, Bettiol H, Barbieri MA, Silva AA, Rondó PH, Lunardelli AN, Peres MA, Gurgel RQ, Cunha AL, Calvano LM, Amin J, Leal MC, Matos ACG, Maranhão AG, Cortez-Escalante, JJ, Barros AJD, Barros FC, Victora CG. Prevalência de nascimentos pré-termo por peso ao nascer: revisão sistemática. Rev Saúde Pública 2013;47(5):992 DOI: 10.1590/S0034-8910.2013047004997.

Silveira MF, Santos IS, Barros AJD, Matijasevich A, Barros FC, Victora CG. Increase in preterm births in Brazil: review of population-based studies. Rev Saude Publica. 2008;42(5):957-64. DOI:10.1590/S0034-89102008000500023.

Simonato LE, Garcia JF, Nunes CM, Miyahara GI. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. J. Bras Patol Med Lab. V.43,n.2,p 121-127. Abril, 2007.

Sinasc. Sistema Nacional de Nascidos vivos. Ministério da Saúde. Rede Interagencial de Informações para a Saúde Indicadores e dados básicos para a saúde. 2014. Disponível em <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=060702>. Acesso Set 2014.

Slots J, Kamma JJ. General health risk of periodontal disease. Int Dent J. 2001 Dec;51(6):417-27. Review. PMID:11789708[PubMed - indexed for MEDLINE].

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent JR RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998; 25: 134-44.

Socransky SS, Haffajee AD. The nature of periodontal diseases. *Ann periodontol*. 1997; 2:3-10.

Spallicci MDB, Chiea MA, Albuquerque PB, Bittar RE, Zugaib M. Estudo de algumas variáveis maternas relacionadas com a prematuridade. *Revista de Med.HU-USP,v.10,n.1,jan.,/jun,2000*.

Standar K, Kreikemeyer B, Redanz S, Münter WL, Laue M, Podbielski A. Setup of an in vitro test system for basic studies on biofilm behavior of mixed-species cultures with dental and periodontal pathogens. *PLoS One*. 2010 Oct 1;5(10). pii: e13135. doi: 10.1371/journal.pone.0013135. PMID:20957048 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Stathopoulou PG, Galicia JC, Benakanakere MR, Garcia CA, Potempa J, Kinane DF. *Porphyromonas gingivalis* induce apoptosis in human gingival epithelial cells through a gingipain-dependent mechanism. *BMC Microbiol*. 2009. May 27;9:107. doi: 10.1186/1471-2180-9-107.PMID:19473524[PubMed - indexed for MEDLINE].

Swati P, Thomas B, Vahab SA, Kapaettu S, Kushtagi P. Simultaneous detection of periodontal pathogens in subgingival plaque and placenta of women with hypertension in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*. 2012 Mar;285(3):613-9. doi: 10.1007/s00404-011-2012-9. Epub 2011 Aug 10. PMID:21830010 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Takeuchi N, Ekuni D, Irie K, Furuta M, Tomofuji T, Morita M, Watanabe T. Relationship between periodontal inflammation and fetal growth in pregnant women: a cross-sectional study. *Arch Gynecol Obstet*. 2013 May;287(5):951-7. doi: 10.1007/s00404-012-2660-4. Epub 2012 Dec 7.PMID:2322469. [PubMed - in process].

Varshney S, Akansha G. Poor periodontal health as a risk factor for development of pre-eclampsia in pregnant women.. *J Indian Soc Periodontol*. 2014 May-Jun; 18(3): 321–325. doi: 10.4103/0972-124X.134569. PMCID: PMC4095624

Vasconcelos JDAL, Santos ACC, Batista ALA, Granville-Garcia AF, Santiago LM, Menezes VA.Fatores de risco relacionados à prematuridade ao nascer: um estudo caso-controle. *Odonto*. 20(40), 2012. P.119-127.

Vettore MV. Doença Periodontal e prematuridade e ou baixo peso ao nascer. Tese (doutorado). Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2006.

Vogt M, Sallum AW, Cecatti JG, Morais SS. Reprod Health. Periodontal disease and some adverse perinatal outcomes in a cohort of low risk pregnant women. 2010 Nov 3;7:29. doi: 10.1186/1742-4755-7-29. MID:21047427[PubMed]. PMCID:PMC2987758.

Wakabayashi H, Kondo I, Kobayashi T, Yamauchi K, Toida T, Iwatsuki K, Yoshie H. Periodontitis, periodontopathic bacteria and lactoferrin. Biometals. 2010 Jun;23(3):419-24. doi: 10.1007/s10534-010-9304-6. Epub 2010 Feb 14. Review.. PMID:20155438 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Wang Q, Zhou XD, Zheng QH, Wang Y, Tang L, Huang DM. Distribution of Porphyromonas gingivalis fimA genotypes in chronic apical periodontitis associated with symptoms. J Endod. 2010 Nov;36 (11):1790-5. PMID: 20951289 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Watanabe T, Maruyama F, Nozawa T, Aoki A, Okano S, Shibata Y, Oshima K, Kurokawa K, Hattori M, Nakagawa I, Abiko Y. Complete Genome Sequence of the Bacterium Porphyromonas gingivalis TDC60, Which Causes Periodontal Disease. J. Bacteriol. 193 (16), 4259-4260, 2011.

Wilderer PA, Charaklis WG. Structure and function of biofilms. In : Charaklis WG, Wilderer PA eds. Structure and function of biofilms, Chichester, UK: John Wiley, pp 5-17. 1989.

Williams C, Davenport ES, Sterne J, Sivapathasundaram V, Fearn JM, Curtis MA. Mechanisms of risk in preterm low birth weight infants. Journal of Periodontology, 2002, v.73, p.1177-1183.

World Health Organization. The incidence of low birth weight: A critical review of available information. World Health Stat. Quart. 33:197-224, 1980.

World Health Organization -WHO. Born too Soon. The Global Action Report on Preterm Birth. Geneva: WHO; 2012.

Yalcin F, Eskinazi E, Soydinc M, Basegmez C, Issever H, Isik G, Berber L, Has R, Sabuncu H, Onan U, The effect of sociocultural status on periodontal conditions in pregnancy. J periodontal. 2002. Feb; 73(2):178-82.

Yamaguchi M, Sato K, Yukitake H, Noiri Y, Ebisu S, Nakayama KA. *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative glycosyltransferase exhibits defective biosynthesis of the polysaccharide portions of lipopolysaccharide, decreased gingipain activities, strong autoaggregation, and increased biofilm formation. Infect Immun. 2010 Sep;78 (9):3801-12. Epub 2010 Jul 12. PMID:20624909 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Yang CY, Wang HC, Li JM, Wang JY, Yang KC, Ho YK, Lin PY, Lee, LN, Yu Cj, YANG PC, Hsueh PR. Invasive infections of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. J Microbiol Immunol Infect. 2010 Dec; 43(6):491-7. PMID:21195976 [PubMed - indexed for MEDLINE].

Zanatta FB, Machado E, Zanatta GB, Fiorini T. Doença periodontal materna e nascimento prematuro e de baixo peso: uama revisão crítica das evidências atuais. Arquivos Catarinenses de Medicina.v.36,n.1, p.95-102. 2007.

Zanbon JJ, Christersson LA, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodotal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. J Periodontol 1983; 54 (11): 703-11.

Zaric S, Shelburne C, Darveau R, Quinn DJ, Weldon S, Taggart CC, Coulter WA. Impaired immune tolerance to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide promotes neutrophil migration and decreased apoptosis. Infect Immun. 2010Oct;78(10):4151-6. doi: 10.1128/IAI.00600-10. Epub 2010 Aug 2. PMID:20679442 [PubMed - indexed for MEDLINE].

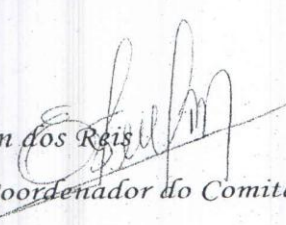
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS

*Carta de Aprovação*

O protocolo nº 2273 CAAE 0345.0.049.000-11 da Pesquisadora Elizete da Rocha Vieira de Barros, intitulado "Doença periodontal, prematuridade e identificação de microorganismos por reação em cadeia da polimerase em tempo real", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 15 dezembro de 2011, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.


Edilson dos Reis

Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 15 de dezembro de 2011.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

ANEXO B – Quadro representativo dos dados obtidos de arquivo Miglioli (2003)

MAT Nº	ID MÃE	GEMELAR	IG	FEBRE	DISÚRIA	ITU	BR+18HS	HOSPITAL	PARTO	CS	CP	CULTURA	
												BACTEC - SANGUE	PLACENTA
13	24	N	AT	S	N	N	N	Pró- M	c	-	+	neg	Staneg
17	23	N	PT	N	N	N	N	NHU	c	-	-	neg	Neg
19	19	N	AT	S	N	S	N	NHU	n	+	+	Staneg	Staneg
20	26	N	AT	N	S	S	N	NHU	n	+	+	E.coli	Leveduras
26	15	N	PT	N	N	N	N	AAMI	n	+	+	Enterococcus	Staneg/Streptococcus sp/Acinetobacter
27	21	N	AT	N	S	N	N	AAMI	c	+	+	Staneg	Staneg
32	43	N	PT	N	N	N	N	Pró-M	c	-	+	neg	Staneg
46	20	N	PT	N	N	N	N	SC	n	-	+	neg	Staneg
48	18	N	AT	S	N	N	N	SC	n	+	+	Streptococcus sp	Enterococcus SP
49	16	N	AT	N	N	N	N	SC	n	-	+	neg	Staneg
50	23	N	PT	N	N	N	N	AAMI	n	-	-	neg	Neg
52	16	N	AT	N	N	S	N	SC	n	+	+	E.coli	E.coli
53	13	S	PT	N	N	N	N	SC	c	+	+	Staneg	Staneg
54	21	N	PT	N	S	S	S	SC	n	+	+	Streptococcus sp	Streptococcus SP
59	23	N	PT	N	N	S	N	NHU	c	-	-	neg	Neg
60	27	N	AT	N	N	S	N	NHU	c	-	-	neg	Neg
61	41	N	AT	N	N	S	N	NHU	n	+	+	Staneg	Staneg
62	25	N	PT	S	S	S	N	NHU	c	-	+	neg	Staneg
63	19	N	PT	N	N	N	S	NHU	c	+	+	BGP	Staneg
64	22	N	AT	N	N	S	N	NHU	c	-	+	neg	Staneg
(óbito) 68	18	N	AT	N	N	N	N	NHU	c	-	+	neg	Staneg

MAT Nº	ID MÃE	GEMELAR	IG	FEBRE	DISÚRIA	ITU	BR+18HS	HOSPITAL	PARTO	CS	CP	CULTURA	
												BACTEC - SANGUE	PLACENTA
69	34	S	AT	S	N	S	N	Pró-M	c	-	-	neg	Neg
70	34	S	AT	S	N	S	N	Pró-M	c	-	+	neg	Staneg
73	21	N	AT	S	N	N	S	SC	c	+	+	S.aureus	S.aureus / Staneg
74	17	N	AT	S	N	N	N	SC	n	-	+	neg	Staneg
75	16	N	AT	N	N	S	S	SC	n	-	+	neg	Staneg
78	28	N	AT	N	N	N	N	SC	c	+	+	Staneg	Staneg
80	21	N	AT	N	N	N	S	NHU	c	-	+	neg	Staneg
81	39	N	AT	N	N	S	N	NHU	c	-	-	neg	Neg
83	23	N	AT	N	N	N	S	NHU	c	-	-	neg	Neg
84	25	N	AT	N	N	N	N	NHU	c		+	sem material	Staneg
85	17	N	AT	N	S	N	N	NHU	c	-	+	neg	BGP
86	18	N	AT	N	N	S	N	AAMI	c	-	+	neg	Staneg / Leveduras
87	26	N	AT	N	N	N	S	AAMI	n	+	-	BGP	Neg
88	17	N	AT	N	S	N	N	AAMI	c	-	-	neg	Neg
89	27	N	AT	N	N	N	N	AAMI	c	-	-	neg	Neg
90	27	N	AT	N	N	S	N	NHU	n	+	+	E.coli	BGP
91	24	N	AT	N	N	S	N	Pró-M	c	-	+	neg	Staneg
92	23	N	AT	N	N	S	N	Pró-M	c	+	+	Staneg	Staneg
93	31	N	PT	S	N	S	N	Pró-m	c	-	+	neg	Staneg
94	35	N	AT	S	N	N	N	Pró-m	c	-	+	neg	Staneg
97	20	N	AT	N	N	S	S	NHU	c	-	+	neg	Staneg
101	19	N	AT	N	N	N	N	NHU	c	+	+	Staneg	Staneg
103	20	N	PT	N	N	N	N	NHU	n	-	+	neg	Fungo filamentoso
104	17	N	PT	N	N	N	N	NHU	c	-	-	neg	Neg

.....continua

MAT Nº	ID MÃE	GEMELAR	IG	FEBRE	DISÚRIA	ITU	BR+18HS	HOSPITAL	PARTO	CS	CP	CULTURA	
												BACTEC - SANGUE	PLACENTA
110	26	N	AT	N	N	S	N	SC	C	+	-	Staneg	Neg
114	15	N	PT	N	N	N	N	SC	N	+	+	Streptococcus sp	Staneg
115	27	N	AT	N	N	S	N	SC	N	+	-	E.coli	Neg
117	18	N	AT	S	N	N	N	NHU	N	+	-	Staneg	Neg
118	28	N	PT	S	N	N	N	NHU	N	-	+	neg	Staneg / S. aureus
119	28	N	AT	N	N	S	N	NHU	C	-	+	neg	Staneg / F.filamentoso
120	32	N	PT	S	N	N	S	NHU	C	-	-	neg	Neg
123	40	S	PT	N	N	N	N	Pró-M	C	+	+	Staneg	Staneg
127	26	S	PT	N	N	N	N	SC	C	+	+	E.coli	Staneg
133	17	N	AT	N	N	S	N	SC	N	+	+	Staneg / Streptococcus sp	Staneg
158	34	S	AT	S	N	S	N	HMC	C	-	+	neg	Staneg

Legenda: N – não, S –sim, AT – a termo, PT – pré-termo, NHU – Hospital Universitário, Pró-M – Promatre, SC – Santa Casa, AAMI –

Maternidade Candido Mariano, C – cesariano, N - normal

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA - FAMED

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Você esta sendo convidado a participar em uma pesquisa científica. Você precisa decidir se quer participar ou não.

Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Este estudo está sendo conduzido por ELIZETE DA ROCHA VIEIRA DE BARROS, cirurgiã dentista, do Curso de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul., em nível de doutorado.

A finalidade deste estudo é relacionar a doença periodontal, que afeta as gengivas e o dente, ao nascimento de bebês prematuros, que é um grave problema de saúde pública, econômico e de grande impacto social, com alta prevalência de óbitos dos recém nascidos nestas condições. O objetivo final é a prevenção, por meio de atenção odontológica no pré-natal, para que haja redução de doenças decorrentes da prematuridade que afetam o bebê, bem como da mortalidade.

Você poderá participar deste estudo, respondendo alguns dados sobre sua gravidez e submetendo a um exame clínico da cavidade bucal. Será utilizado material biológico (sangue do bebê) por meio da coleta do mesmo seguindo a rotina hospitalar e parte da placenta da mãe, na ocasião do parto, material este que normalmente é descartado, mas que neste estudo será objeto de análise laboratorial.

Caso concorde em participar, seu nome e do bebê serão mantidos em absoluto sigilo. A menos que requerido por lei, somente o pesquisador (seu médico ou outro profissional) a equipe do estudo, terão acesso a suas informações para verificar as informações do estudo.

Voltamos a lembrar que sua participação é voluntária e você não perderá qualquer benefício a que tenha direito, caso não concorde em participar, podendo mesmo até participar de outros estudos da Universidade.

Para perguntas ou problemas referentes ao estudo ligue para esta pesquisadora – Elizete da Rocha Vieira de Barros – nos telefones (067) 92023265 e (067) 33453209. Para

perguntas sobre seus direitos como participante no estudo chame o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (067) 3345-7187.

Por fim, caso queira participar, favor preencha os campos de identificação (ou deixe que um de nossos pesquisadores preencha para você) e assine. Você receberá uma via assinada deste termo de consentimento. Após ler, entender e esclarecer todas as dúvidas, assine o termo anexo para ser voluntário da pesquisa

Eu, _____ RG _____ Nº _____ SSP/
responsável pelo(a) paciente _____ com registro
nº _____, no Hospital _____, voluntariamente dou o
meu consentimento para participação no estudo: **DOENÇA PERIODONTAL,
PREMATURIDADE E IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS POR REAÇÃO
EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL –PCR.**

Conheço os objetivos do mesmo e estou ciente da sua realização. Deram-me a oportunidade de esclarecer todas e quaisquer dúvidas.

Estou ciente de que poderei deixar de participar do estudo sem que com isto tenha o meu tratamento prejudicado.

Autorizo que os dados possam ser utilizados pela pesquisadora da Instituição (UFMS) com finalidade de publicação em órgão de divulgação científica.

Se tiver dúvida a respeito deste estudo poderei ligar para a pesquisadora Elizete da Rocha Vieira de Barros – nos telefones (067) 9202-3265 e (067) 3345-3209. Para perguntas sobre meus direitos como participante no estudo poderei procurar o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (067) 3345-7187.

Tenho ciência que este documento foi feito em duas vias, uma que ficará com a pesquisadora e a outra comigo.

Campo Grande, _____ de 2011

Assinatura da paciente e/ou responsável legal

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO

Identificação do questionário	Nome (iniciais) _____
Nº _____	Data da entrevista: ____/____/____
Código da Instituição _____	
Revisado em : ____/____/____	
Digitado em: ____/____/____	

Questionário para seleção das mães (Parte I)

1. Quantos anos completos a Sra. tem? _____
- 2 A senhora usa dentadura?
Sim () **encerrar o questionário** () Não
- 3 A Sra. possui alguma doença?
Sim () Não () Não sei ()
4. Diabetes antes da gravidez? Sim () Não()
- 5 AIDS antes da gravidez ? Sim () Não ()
- 6 Doença cardíaca ? Sim () Não()
- 7 Alguma outra doença ? Sim () Não()
- 8 A Sra. toma algum remédio? Sim () Não()
- 9 Para que a Sra toma o remédio? _____
- 10 A Sra. já tomou algum remédio para hipertensão (pressão alta) epilepsia ou transplante de órgão? _____
- 11 A sra usou algum antibiótico na última semana? _____
- 12 A Sra recebeu tratamento para sua gengiva no dentista nos últimos seis meses?

Pesquisador:

A paciente atende os critérios para participação na pesquisa?

Sim () Não ()

Se Sim, segue para Parte II

1 Qual a sua Idade(anos): _____

2 Qual a sua cor ou raça?

1 Branca	2 Preta	3 Amarela	4 Parda	5 Indígena
----------	---------	-----------	---------	------------

3. Escolaridade:

1 Sem instrução (não sabe ler e escrever)	2 Ensino fundamental A completo B Incompleto	3 Ensino médio A completo B Incompleto	4 Superior A completo B Incompleto
--	--	--	--

4 Excluindo o trabalho de dona de casa, a Sra teve algum trabalho remunerado na gestação?

() Sim () Não Em que? _____

5 Estado marital:

1 solteira	2 casada	3 divorciada ou separada	4 com companheiro	5 Outro
------------	----------	-----------------------------	----------------------	---------

6 O domicílio que a Sra. mora é ? (Adaptado Censo 2010/IBGE)

1 Próprio já pago	2 Próprio, ainda pagando	3 Cedido de outra forma	4 Alugado	5 Outra condição
-------------------	--------------------------------	----------------------------	-----------	------------------

7. Qual é o seu rendimento mensal atual ? (Adaptado Censo 2010/IBGE)

(devem ser somados todos os rendimentos mensais de trabalhos e de outras fontes da pessoa)

1 Em dinheiro	2 Somente em benefícios	3 não tem	4 Outra condição
---------------	-------------------------------	-----------	------------------

B - Características Comportamentais

8 A senhora ingeriu bebidas alcoólicas durante a gravidez?

Sim () Não () Ocasionalmente()

9 Se sim ou ocasionalmente, qual a frequência?

Diariamente () Semanalmente() Raramente()

10 A Sra. fumava antes da gravidez?

Sim () Não ()

11 Quantos cigarros por dia? _____ cigarros

12 Há quanto tempo a senhora é fumante? _____

13 A Sra. fumou durante a gravidez?

Sim () Não ()

14 Com que frequência? _____ cigarros /dia

C - História médica e obstétrica

15 A Sra teve algum problema de saúde durante a gravidez

Pressão alta na gravidez ()

Pré-eclampsia ()

Hepatite B ()

Anemia()

Diabetes gestacional ()

Infecção Urinária ()

16 Outras infecções? _____ Qual? _____

17 Tomou algum medicamento de uso contínuo durante a gravidez? _____ Qual? _____

18 Quantas vezes esteve grávida excluindo esta gravidez? _____

19 Alguma gravidez resultou em aborto? _____

20 Sem contar com esta gravidez, a Sra já teve algum bebê prematuro? (que tenha nascido antes dos nove meses?)

21 Nesta gestação, a Sra fez pré-natal?

22 Quantas consultas de Pré-natal?:

D - Características do Recém Nascido

23 Sexo do bebê:

24 Qual o peso do bebê no nascimento : _____

25 Com quantas semanas nasceu seu bebê? _____

26 Qual o comprimento? _____

27 O recém nascido apresentou problemas de saúde no nascimento:

28 Se sim, qual? _____

E - História de Saúde Bucal na gravidez

29 Teve dor nos dentes e/ou gengiva na gravidez?

30 Teve sangramento da gengiva

31 Quantas vezes escovava os dentes

32 Fez algum tratamento odontológico

33 Onde foi a sua última consulta?

1-Serviço público; 2-Serviço particular; 3-Plano de Saúde ou Convênios; 4-Outros

34 Qual o motivo da sua última consulta?

1-Revisão, prevenção ou check-up; 2-Dor; 3-Extração; 4-Tratamento; 5-Outros;

35 A Sra acha que necessita de tratamento dentário atualmente? 0-Não; 1-Sim;

APÊNDICE C – AVALIAÇÃO CLÍNICA PERIODONTAL

Foi adotado referenciais propostos em levantamento epidemiológico brasileiro SBBrasil-2010 (Roncalli *et al*, 2012). Nesta pesquisa, adaptou-se às variáveis utilizadas para observação em: presença ou ausência de sangramento, cálculo e bolsa. Foi utilizado espelho clínico nº 5, pinça clínica, palito de madeira e sonda OMS (com esfera de 0,5 mm na ponta e área anelada em preto situada entre 3,5 mm e 5,5mm da ponta).

A boca foi dividida em sextantes definidos e buscados os seguintes dentes denominados de índices, como representativos para os mesmos: superior direito (dentes 17 ou 16), superior central (dente 11), superior esquerdo (dente 37 ou 36), inferior esquerdo (dente 37 ou 36), inferior central (dente 31), inferior direito (dentes 46 e 47). O registro das condições foi feito de forma separada para sangramento, cálculo e bolsa, do seguinte modo e anotados na ficha periodontal: Sangramento- 0 – ausência, 1 – presença, e 9 - Não examinado; Cálculo dentário - 0 – ausência, 1 – presença, e 9- Não examinado; Bolsa Periodontal – 0 – ausência, 1 – presença de bolsa , e 9 – não examinado.

Por tratar-se de uma avaliação feita no leito hospitalar, com a iluminação disponível, e condições de umidade adversas, optou-se por utilizar a sonda periodontal apenas na face vestibular e não definir a perda de inserção em milímetros para a variável bolsa periodontal, apenas visualizar a entrada da mesma no sulco, guiando-se pela milimetragem inicial.

Os procedimentos de exame foram feitos por elemento dentário, iniciados pelo dente mais posterior do sextante superior direito, a seguir para o central, superior esquerdo, inferior esquerdo, central inferior e finalmente o inferior direito. A sonda foi introduzida levemente no sulco gengival ou na bolsa periodontal, ligeiramente inclinada em relação ao longo eixo do dente, seguindo a configuração anatômica da superfície radicular. Movimentos de vai-e-vem vertical, de pequena amplitude foram realizados.

Sabe-se que o tempo de resposta à sondagem da gengiva inflamada é variado. A OMS não define um período de tempo para a observação do sangramento à sondagem. Recomenda-se um tempo de observação após a sondagem de 10 a 30 segundos, critério utilizado na maioria dos índices desta natureza, recomendado também pelos pesquisadores que desenvolveram o CPI (Roncalli *et al*, 2012 - Adaptado SBBrasil, 2010).

				
Código 0	Código 1	Código 1	Código 1	Código 9
Ausência	Presença de Sangramento	Presença de cálculo	Presença de bolsa	Ausência do dente
Quando não foi detectado nenhum sinal de sangramento, cálculo ou bolsa periodontal ao exame	Quando os dentes-índices apresentava sangramento após a sondagem.	Cálculo detectado em qualquer quantidade, mas com toda a área preta da sonda visível.	Quando a marca preta da sonda ficou parcialmente coberta pela margem gengival. A marca inferior da área preta correspondia a 3,5 mm e a superior 5,5 mm,	Quando não haviam os dentes índices para serem examinados

Fonte : Adaptado do SBBrasil 2010

Nome do Paciente:

Código da Instituição:

Data:

**SANGRAMENTO
GENGIVAL**

0 – Ausência
 1 – Presença
 X – Excluído
 9 – Não Examinado

**BOLSA
PERIODONTAL**

0 – Ausência
 1 – Presença de bolsa rasa
 2 – Presença de bolsa profunda
 X – Excluído
 9 – Não Examinado

CONDICÃO PERIODONTAL

17/16	→		→	
11				
26/27				
37/36				
31				
46/47				
SANGRAMENTO GENGIVAL		CÁLCULO DENTÁRIO		BOLSA PERIODONTAL

CÁLCULO DENTÁRIO

0 – Ausência
 1 – Presença
 X – Excluído
 9 – Não Examinado

APÊNDICE D – TABELAS RELATIVAS À DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS E PERCENTUAIS DAS VARIÁVEIS: SOCIO-DEMOGRÁFICAS, RISCOS OBSTÉTRICOS, SAÚDE BUCAL MATERNA E NEONATAIS.

Tabela 1 - Distribuição de frequência (n) e percentual (%) das variáveis sócio-demográficas maternas, Centro Obstétrico, HU/UFMS, Campo Grande, MS-2014

Variáveis sócio-demográficas	Frequencia (n)	Percentual (%)
Idade materna		
Até 19 anos	3	15,3
20 a 30 anos	12	63,5
31 a 40 anos	2	10,6
40 ou mais	2	10,6
Total	19	100,0
Côr		
Branca	7	36,8
Parda	12	63,2
Total	19	100,0
Escolaridade da mãe		
Fundamental Completo	1	5,9
Fundamental incompleto	6	35,3
Ensino Médio completo	5	29,4
Ensino Médio incompleto	3	17,6
Superior completo	1	5,9
Superior incompleto	1	5,9
Total	19	100,0
Ocupação		
Do lar	13	68,4
Trabalho fora do domicílio	6	31,6
Total	19	100,0
Domicílio		
Próprio, já pago	7	36,8
Próprio, ainda pagando	2	10,5
Cedido	3	15,8
Alugado	3	15,8
Outra condição	4	21,1
Total	19	100,0
Renda		
1 salário	1	5,3
1,5 salários	2	10,5
2 salários	8	42,1
2,5 salários	3	15,8
3,0 sal	1	5,3
Outra condição (benefício)	4	21,1
Total	19	100,0

Tabela 2 - Distribuição de frequência (n) e percentual (%) das variáveis relativas aos fatores de risco principais, obstétricos, Centro Obstétrico, HU/UFMS, Campo Grande, MS – 2014

Fatores de risco e obstétricos	Frequencia (n)	Percentual(%)
Doença referida		
Não	9	47,4
Sífilis	3	15,8
Hipertensão	4	21,1
ITU	1	5,3
Hipotireoidismo	1	5,3
Depressão	1	5,3
Total	19	100
Medicação de uso contínuo		
Sim	4	21,1
Não	15	78,9
Total	19	100,0
Alcoolismo		
Sim	0	0
Não	19	100
Total	19	100
Tabagismo prévio		
Sim	5	26,3
Não	14	73,7
Total	19	100,0
Consulta pré natal		
Mais que 7	4	21,1
Menos que 7	14	63,6
Nenhuma	1	5,3
Total	19	100,0
Idade Gestacional		
Até 29 semanas	2	10,6
30 até 34 semanas	7	36,9
35 a 36 semanas	10	52,7
Total	19	100,0

Tabela 3 - Distribuição de frequência (n) e percentual (%) das variáveis relativas a saúde bucal materna, Centro Obstétrico, HU/UFMS, Campo Grande, MS-2014

Variáveis - saúde bucal materna	Frequencia(n)	Percentual (%)
Motivo ultima Consulta odontológica		
Revisão, prevenção ou checkup	4	21,1
Dor	5	26,3
Extração	2	10,5
Tratamento	2	10,5
Outros motivos (ver)	6	31,6
Total	19	100
Sangramento gengival		
Sim	7	36,8
Não	12	63,2
Total	19	100,0
Informação - saúde bucal gravidez		
Sim	4	21,1
Não	15	78,9
Total	19	100,0

Tabela 4 - Distribuição de frequência (n) e percentual (%) das variáveis neonatais, Centro Obstétrico, HU/UFMS, Campo Grande, MS- 2014

Variáveis neonatais	Frequencia	Percentual (%)
Sexo		
Masculino	11	57,9
Feminino	8	42,1
Total	19	100,0
Peso ao nascer		
Menor ou igual a 1499g	3	15,9
1500g a 1999g	3	15,9
2000g a 2500g	4	21,2
Acima de 2500g	9	47,7
Total	19	100,0
Gemelaridade		
Sim	2	10,5
Não	17	89,5
Total	19	100,0

**APÊNDICE E – TABELAS REPRESENTATIVAS DA QUANTIFICAÇÃO DE DNA
DAS AMOSTRAS EM DIFERENTES ESPÉCIMES (SANGUE DO
CORDÃO UMBILICAL, HILO PLACENTÁRIO E EXSUDATO DO
SULCO GENGIVAL)**

Tabela 1 - Resultado da quantificação de DNA de amostras de sangue do cordão umbilical obtido por espectrofotometria (em 12 µl), NUFIGEN/ICB-UFMG, BH – 2014

Amostra	230	260	280	320	260/280	260/230	[] ug/uL
1	-3,48	-3,11	-3,12	-3,25	1,030	-0,591	0,007
2	-3,71	-3,57	-3,57	-3,67	1,095	-2,889	0,005
3	-3,12	-2,88	-2,88	-3,03	1,020	-1,747	0,008
4	-2,06	-1,75	-1,74	-1,93	0,947	-1,341	0,009
5	-3,06	-2,76	-2,75	-2,91	0,981	-1,034	0,008
6	-1,94	-1,59	-1,59	-1,79	1,000	-1,275	0,010
7	-2,32	-2,01	-1,99	-2,18	0,894	-1,225	0,008
8	-3,72	-3,59	-3,58	-3,68	0,904	-2,238	0,005
9	-3,81	-3,6	-3,6	-3,7	0,97	-0,898	0,005
10	-0,009	0,38	0,37	0,143	1,045	-1,526	0,012
11	-0,01	0,39	0,41	0,218	0,887	-0,759	0,009
12	-3,77	-3,49	-3,48	-3,58	0,86	-0,446	0,004
13	-3,47	-3,23	-3,22	-3,35	0,961	-0,992	0,006

* quantidade total de DNA por amostra variou de 0,004 a 0,012 por ug/uL.

Tabela 2 - Resultado da quantificação do DNA obtido de amostras de material do sulco gengival obtido por espectrofotometria (12µl), NUFIGEN/ICB-UFMG, BH – 2014

Amostra	230	260	280	320	260/280	260/230	[] ug/uL
1	-2	-3,21	-3,43	-3,74	1,738	0,305	0,026
2	-1,56	-1,79	-1,91	-2,21	1,405	0,646	0,021
3	-2,85	-3,24	-3,44	-3,75	1,667	0,567	0,025
4	-1,7	-2,79	-3,1	-3,58	1,646	0,42	0,039
5	1,22	0,75	0,6	0,253	1,429	0,515	0,025
6	2,21	1,78	1,66	1,35	1,378	0,5	0,021
7	-1,82	-2,87	-3,15	-3,66	1,549	0,429	0,039
8	-1	-0,66	-1,11	-1,77	1,682	1,442	0,056
9	-1,74	-1,86	-2,07	-2,47	1,525	0,836	0,031
10	-0,84	-0,84	-1,04	-1,45	1,488	1	0,031
11	-2,18	-2,14	-2,33	-2,67	1,559	1,082	0,026
12	0,54	0,62	0,44	0,047	1,462	1,163	0,029

*quantidade total de DNA por amostra variou de 0,021 a 0,056 por ug/uL.

Tabela 3 - Resultado da quantificação de DNA genômico em amostras de placenta obtidas por espectrofotometria, NUFIGEN/ICB-UFMG, BH – 2014

Amostra	230	260	280	320	260/280	260/230	[] ug/uL
1	-0,75	-2,88	-2,96	-3,38	1,381	0,221	0,029
2	0,91	0,01	-0,47	-1,32	1,565	0,596	0,067
4	22,24	3,09	1,87	-3,57	1,224	0,258	0,333
5	10,61	0,97	0,18	-3,46	1,217	0,315	0,221
6	0,45	-2,89	-3,13	-3,71	1,414	0,197	0,041
7	-0,34	-3,01	-3,22	-3,79	1,368	0,226	0,039
8	9,92	0,69	-0,15	-3,18	1,277	0,295	0,193
9	-0,26	-2,76	-2,99	-3,82	1,277	0,298	0,053
10	10,59	1,04	0,32	-2,83	1,229	0,288	0,193
11	13,44	2,52	1,11	-3,62	1,298	0,36	0,307
12 ^a	8,89	-0,38	-1,02	-3,71	1,238	0,264	0,167
12b	-1,65	-2,9	-3,16	-3,75	1,441	0,405	0,043
13	4,5	-1,66	-2,01	-3,31	1,269	0,211	0,083
14	24,79	6,04	4,74	-1,1	1,223	0,276	0,357
15	19,55	5,82	4,57	-0,54	1,245	0,317	0,318
16	5,61	0,31	-0,17	-2,21	1,235	0,322	0,126
17	2,52	-1,8	-2,18	-3,75	1,242	0,311	0,097
18	15,59	2,09	0,92	-3,29	1,278	0,285	0,269
19	8,97	-0,26	-0,84	-3,36	1,23	0,251	0,155

* quantidade total de DNA por amostra variou de 0,029 a 0,333 por **ug/uL**.

APÊNDICE F - QUANTIFICAÇÃO DO RNA DA PLACENTA

Tabela 1 - Resultado da quantificação do RNA em amostras de placenta obtidas por espectrofotometria, em 50 uL, NUFIGEN/ICB-UFMG, BH – 2014

Amostra	230	260	280	320	260/280	260/230	[] ug/uL
1	48,24	14,62	9,32	-0,307	1,55	0,308	0,597
2	24,05	11,43	6,41	0,034	1,787	0,475	0,456
3	16,52	7,12	6,34	4,2	1,364	0,237	0,117
4	12,32	5,41	4,55	1,18	1,255	0,38	0,169
5	11,16	7,63	5,07	1,53	1,723	0,633	0,244
6	7,86	6,38	4,74	2,25	1,659	0,736	0,165
7	12,62	8,36	6,54	1,86	1,389	0,604	0,26
8	6,17	3,82	2,92	0,8	1,425	0,562	0,121
9	3,73	2,28	2,02	1,47	1,473	0,358	0,032
10	4,07	1,23	0,99	0,329	1,364	0,241	0,036
11	32,1	17,31	12,39	2,99	1,523	0,492	0,573
12	3,11	2,68	2,22	0,153	1,222	0,855	0,101
13	16,49	5,6	4,49	1,83	1,417	0,257	0,151
14	2,81	2,09	1,72	-0,183	1,195	0,759	0,091
15	11,66	8,3	6	2,29	1,62	0,641	0,24
16	6,35	6,06	4,37	0,35	1,467	0,948	0,212
17	4,02	2,3	1,79	0,36	1,357	0,53	0,078
18	2,82	1,18	0,95	0,66	1,818	0,241	0,021
19	2	1,5	1,26	0,42	1,286	0,684	0,043

APÊNDICE G - QUANTIFICAÇÃO DO DNA PLACENTAS - TRIAGEM

Tabela 1 - Resultado da quantificação de DNA genômico da triagem em amostras de placenta de banco de estoque, obtidas por espectrofotometria, NUFIGEN/ICB-UFMG, BH – 2014

Amostra	230	260	280	320	260/280	260/230	[] ug/uL
13	23,06	43,2	24,78	1,32	1.785	1.926	2,094
17	8,78	8,14	7,31	6,07	1.669	0,764	0,104
19	12,41	13,84	10,76	6,23	1.680	1.231	0,38
20	1,16	2,02	1,11	-0,025	1.814	1.723	0,102
26	8,34	7,14	5,18	2,02	1.620	0,81	0,256
27	13,12	26,43	15,43	2,02	1.820	2.199	1
28	2,12	2,47	2,22	1,86	1.694	2.392	0,031
32	31,82	58,08	34	4,04	1.804	1.945	3
46	15,2	33,48	18,58	0,523	1.825	2.245	2
48	56,98	75,48	50,44	16,24	1.732	1.454	3
49	8,25	11,5	8,37	4,26	1.762	1.815	0,362
50	8,08	9,52	8,16	6,46	1.800	1.889	0,153
52	9,47	10,89	8,81	5,63	1.654	1.370	0,263
53	15,4	22,82	16,42	7,27	1.699	1.913	0,777
54	7,42	10,75	6,98	1,85	1.735	1.598	0,445
59	18,43	34,52	21,02	4,24	1.805	2.134	2
60	9,83	11,53	9,38	6,44	1.731	1.501	0,255
61	18,06	21,84	16,06	6,94	1.634	1.340	0,745
62	12,02	18,91	13,18	5,72	1.768	2.094	0,66
63	3,04	4,82	3,15	1,01	1.780	1.877	0,191
68	3,87	5,81	4,15	1,92	1.744	1.995	0,194
69	18,65	27,7	17,61	4,21	1.753	1.627	1
70	8,99	11,94	8,85	4,82	1.767	1.707	0,356
73	19,75	29,73	1791	2,17	1.751	1.568	1
74	12,98	16,9	12,88	5,62	1.554	1.533	0,564
75	14,56	25,99	16,43	4,45	1.798	2.131	1
78	4,41	6,12	4,67	2,66	1.721	1.977	0,173
80	6,21	5,86	5,75	5,66	2.130	0,356	0
81	5,17	8,31	5,51	1,89	1.773	1.957	0,321
83	1,55	2,58	1,56	0,258	1.785	1.798	0,116
84	8,76	13,92	940	3,65	1.786	2.010	0,513
85	17,57	31,32	20,11	5,9	1.789	2.178	1
87	13,53	14,56	10,88	5,48	1.681	1.128	0,454
88	13,21	13,49	10,62	6,17	1.645	1.040	0,366
89	10,47	11,02	8,46	4,63	1.668	1.094	0,319
90	9,18	12,68	8,89	3,78	1.742	1.648	0,445
91	5,19	7,7	4,71	0,84	1.773	1.577	0,343
92	4,79	6,56	4,16	0,94	1.745	1.460	0,281
93	7,29	6,52	6,16	5,76	1.900	0,497	0,038
94	13,79	18,51	13,36	4,77	1.600	1.523	0,687
97	4,8	4,92	4,31	3,31	1.610	1.081	0,08
101	4	4,62	4,13	3,3	1.590	1.886	0,066
103	7,13	9,46	5,85	1,23	1.781	1.395	0,411
104	7,83	12,78	7,86	1,39	1.760	1.769	0,569

.....continua

Amostra	230	260	280	320	260/280	260/230	[] ug/uL
106	6,96	11,92	7,42	1,75	1.794	1.952	0,509
110	6,96	12,01	7,9	2,81	1.807	2.217	0,46
114	12,45	22,34	13,78	3,21	1.810	2.070	0,956
115	12,18	17,05	11,69	4,49	1.744	1.633	0,628
117	12,6	12,86	11,38	6,82	1.325	1.045	0,302
118	10,76	13,8	10,56	5,52	1.643	1.580	0,414
119	1,79	2,79	2,03	0,98	1.724	2.235	0,09
120	6,17	11,92	6,91	0,49	1.780	2.012	0,572
123	12,43	16,74	10,71	2,59	1.743	1.438	0,707
127	10,2	1650	10,2	1,91	1.760	1.760	0,729
133	1,83	2,08	1,79	1,27	1.558	1.446	0,041
141	8,44	7,87	6,91	5,37	1.623	0,814	0,125
153	6,13	11,66	6,95	1,17	1.815	2.115	0,525
157	8,54	9,69	8,2	6,07	1.700	1.466	0,181
158	21,11	22,23	19,74	7,29	1.200	1.081	0,747
159	12,03	17,82	12,61	5,15	1.698	1.842	0,634
160	13,3	16,33	12,78	6,16	1.536	1.424	0,509
161	6,47	6,44	5,97	5,18	1.595	0,977	0,063

*espécimes obtidas de banco de estoque (Migliolli,2003)