

UNIVERSIDADE DE UBERABA

MARCÉLLY MILHOMEM MENDES

Detecção de *Streptococcus mutans* em amostras de saliva, sangues do cordão umbilical e periférico de puérperas de boa saúde geral.

Uberaba

2016

MARCÉLLY MILHOMEM MENDES

Detecção de *Streptococcus mutans* em amostras de saliva, sangues do cordão umbilical e periférico de puérperas de boa saúde geral.

Dissertação apresentada para Defesa de Mestrado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração: Biopatologia.

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

Uberaba

2016

MARCÉLLY MILHOMEM MENDES

Detecção de *Streptococcus mutans* em amostras de saliva, sangues do cordão umbilical e periférico de puérperas de boa saúde geral.

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

Área de concentração: Biopatologia

Aprovada em: ____/02/2016

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr.
Universidade de Uberaba

Prof. Dr.
Universidade de Uberaba

Prof. Dr.
Universidade de Uberaba

Uberaba
2016

DEDICATÓRIA

À Deus em primeiro lugar.

Em especial, aos meus pais Reinaldo e Marcyone pelo apoio incondicional aos meus sonhos e ao meu irmão Pedro, pela amizade e carinho.

A todos os meus familiares que me incentivaram a dar continuidade aos meus estudos.

Aos meus amigos que estiveram sempre presente, me alegrando em momentos de desânimo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Prof^a Dr^a Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins por quem tenho uma grande admiração e carinho. Sou eternamente grata por todos os conselhos de direcionamento acadêmico, profissional e muitas vezes pessoal.

Ao Prof^o Dr Virmondes Rodrigues por toda atenção e colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof^o Dr. Antônio Campos Neto e toda sua equipe do The Forsyth Institute pela paciência e oportunidade de me receber durante meu estágio.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

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

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos Professores do Mestrado pelo apoio e ensinamento.

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

As minhas amigas do laboratório Camila, Rayanne, Rafaella, Juliana e Aline pela colaboração nos procedimentos laboratoriais e momentos de confraternização.

A secretaria do curso de pós-graduação e extensão Flávia Michele da Silva pela prontidão em atender.

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

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

A todos, o meu muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA: Análise de variância.

APC: Antigen Presenting Cell.

CT: Threshold cycle.

DNA: Deoxyribonucleic acid.

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid.

EUA: Estados Unidos da América.

GBP: Glucan Binding Protein.

GTF: Glucosiltransferase.

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

RT-PCR: Real-time polymerase chain reaction.

SA: Saliva materna.

SC: Sangue do cordão umbilical.

SM: *Streptococcus mutans*.

SP: Sangue periférico.

TRIS-HCL: Tris (hidroxi-metil) aminometano - hydrochloric acid.

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

UA 159: University of Alabama.

UNIUBE: Universidade de Uberaba.

USP: Universidade de São Paulo.

°C: Grau Celsius.

cm: Centímetros.

mL: Mililitro.

µL: Microlitro.

g: Força gravitacional.

mM: Milimolar.

nm: Nanômetro.

RESUMO

O período gestacional representa um momento importante para a mãe e filho, pois a exposição materna à antígenos microbianos pode determinar a colonização e desenvolvimento imunológico fetal. A cavidade bucal representa uma porta de entrada de inúmeras espécies bacterianas. Estas por sua vez, podem ocasionar doenças orais importantes, como a cárie dentária, sendo *Streptococcus mutans* (SM) o principal microorganismo envolvido na sua etiologia. Estudos prévios demonstraram que neonatos apresentam anticorpos na saliva contra SM na ausência de níveis detectáveis deste microorganismo, daí a necessidade de investigar a exposição antigênica na vida intrauterina. Os objetivos do presente estudo foram de analisar a presença positiva ou negativa de DNA de SM em amostras de sangue do cordão umbilical (SC), do sangue periférico materno (SP) e salivas maternas (SA) e comparar com dados clínicos em questionários de saúde aplicados na admissão materna. A coleta do material biológico foi realizada na MATER do HC-FMRP em gestantes de boa saúde geral com gestações a termo sem intercorrências. Para tanto, 83 amostras de SC e de SP foram coletadas respectivamente, no dia de internação e após a realização do parto. Amostras de salivas não estimuladas foram obtidas de 64 gestantes. A análise da presença de DNA de SM nas amostras foi realizada através de ensaios de PCR-RT com primers específicos. Os resultados mostraram que mais de 50% das amostras de SP e SC apresentaram SM detectável, estando correlacionadas entre si tanto na detecção positiva ou negativa, quanto na concentração de DNA. Não houve uma correlação entre detecção de SM no SP ou SC com a SA ($p > 0.05$). Os dados clínicos obtidos no questionário mostraram que as gestantes que afirmaram escovar os dentes mais de três vezes ao dia, frequentemente não apresentaram SM detectável na SA, mas sim no SP e SC. Diante do exposto, os resultados permitiram concluir que SM pode ser detectado no ambiente intrauterino através da passagem de DNA do SP para SC independente da presença de SM na que este pode ser transitório na saliva. Hábitos de higiene oral podem colocar SM na circulação pela penetração na gengiva permeável materna e causar uma bacteremia materna.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*, Sangue do cordão umbilical, Sangue, saliva.

ABSTRACT

The gestational period is an important moment for the mother and child because the maternal exposition to the microbial antigen can determine the fetal colonization and the immune development. The oral cavity is a gateway for several bacterial species. These can lead to oral diseases, such as tooth decay in that *Streptococcus mutans* (SM) is the main microorganism involved in its etiology. Previous studies have shown that newborns already have antibodies in saliva against SM in the absence of detectable levels of this microorganism, hence the need to investigate the antigenic exposure in intrauterine life. The objectives of this study were to analyze the positive or negative presence of SM DNA in cord blood samples (BC), maternal peripheral blood (BP) and maternal saliva (SA) and compare with data collected in health surveys applied in maternal admission. The collection of biological material was performed at HC-FMRP of MATER in healthy pregnant women with pregnancies to term and without complications. Therefore, 83 samples of BP and BC were collected on the day of hospitalization and after the delivery respectively. Unstimulated saliva samples were obtained from 64 pregnant women. The analysis of the presence of DNA in the samples SM was performed by PCR-RT assays using specific primers. The results showed that over 50% of the sample of BP and BC showed SM detectable, being correlated as in positive or negative detection as in the concentration of DNA. There was a no correlation between the SM detection in BP/BC and SA ($p>0.05$). Data from the questionnaire showed that pregnant who reported tooth brushing more than three times a day, often showed no detectable SM of SA but the BP and BC. So, the results showed that SM could be detected in the intrauterine environment by transfer of SM-DNA from BP to BC, regardless of the presence of SM in the maternal saliva because it may be transient. Oral hygiene habits can allow that SM get in circulation by the permeability of maternal gum associated with SM's ability to cause bacteremia.

Keywords: *Streptococcus mutans*, blood cord, blood, saliva

SUMÁRIO**Pag.**

1. INTRODUÇÃO	11
2. HIPÓTESE	15
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivos Específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Delineamento do estudo	17
4.2. Coleta de amostras	17
4.3. Detecção de SM nas amostras biológicas	18
4.3.1. Extração de DNA cromossomal bacteriano	18
4.3.2 Quantificação de DNA extraído	20
4.3.3 PCR real time (PCR-RT) das amostras	21
4.4. Análises Estatísticas	23
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXOS	41

1. INTRODUÇÃO

Até meados do ano 2000, a ideia de que os fetos permaneciam estéreis, durante a vida intra-uterina e adquiriam micro-organismos maternos vaginais e fecais quando iniciavam o trânsito pelo canal vaginal durante o trabalho de parto (Mackie *et al.*, 1999) era amplamente aceita. Isto porque a investigação da presença de micro-organismos nestes ambientes só era realizada quando havia sintomas ou em situações que poderiam levar a infecção. No entanto, existem evidências clínicas mais recentes de que há micro-organismos na placenta, sangue do cordão umbilical, líquido amniótico e mecônio em gestações a termo sem infecções evidentes (Bearfield *et al.*, 2002; Steel *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2005,2008; Stout *et al.*, 2013; Aagaard *et al.*, 2014).

Espécies virais como citomegalovírus (Endo *et al.*, 2009), papilomavírus (Rombaldi *et al.*, 2009) e zika vírus (Calvet *et al.*, 2016) puderam ser detectadas no sangue do cordão umbilical de bebês recém nascidos. Estudo de Jimenez e colaboradores (2005), em amostras de sangue de cordão umbilical, detectaram a presença de várias espécies bacterianas tais como: *Enterococcus faecium*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus sanguinis*. Curiosamente, estas espécies, são naturalmente presentes em crianças desde os primeiros dias de vida (Favier *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2003) e em crianças predispostas, pode haver o desenvolvimento de infecções oportunistas em presença de tais espécies (Jimenez *et al.*, 2005). A análise de mecônio de neonatos saudáveis, apresentou níveis detectáveis de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, sugerindo que ao contrário do que se pensava, esse material biológico pode não ser estéril (Favier *et al.*, 2002) e refletem a exposição microbiana do ambiente intrauterino.

Estas evidências de influxo microbiano entre mãe e filho, suscitam diversas discussões a respeito da transferência de micro-organismos comensais detectáveis na mãe para o feto, como por exemplo, os albergados na cavidade bucal. A cavidade oral possui

mais de 700 tipos diferentes de bactérias, que de forma dinâmica, constituem a microbiota oral composta por micro-organismos transitórios e residentes. Estudos em modelos animais, de infecção ativa oral com micro-organismos comensais, permitiram a detecção de vários destes patógenos no feto e placenta (Lin *et al.*, 2003; Boggess *et al.*, 2005; Fardini *et al.*, 2010). Um estudo recente, do sequenciamento de amostras de placentas mostrou que o microbioma placentário não se assemelha aos microbiomas vaginais ou intestinais, como se pensava anteriormente, pois é mais semelhante à microbiota oral normal, especialmente da língua e amígdala (Aagaard *et al.*, 2014).

A literatura é ampla na descrição da condição periodontal materna durante a gestação, com ênfase nos micro-organismos periodontopatogênicos, envolvidos na provável etiologia de nascimentos prematuros. Nesse contexto, a doença periodontal tem sido associada a alterações durante a gestação e aumento do risco de prematuridade e baixo peso ao nascer (Davenport *et al.*, 2002; Rajapakse *et al.*, 2005; Offenbacher *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2006; Michalowicz *et al.*, 2006; Radnai *et al.*, 2006; Katz *et al.*, 2006; Bassani *et al.*, 2007). Já foram identificados patógenos periodontais como *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus spp* no líquido amniótico de mulheres que tiveram partos prematuros (Bearfield *et al.*, 2002). Embora não esteja claro o mecanismo exato da associação entre doença periodontal e parto prematuro, acredita-se que a presença de infecções periodontais desencadeie respostas inflamatórias na mãe e nos tecidos fetais, através da produção de prostaglandinas, aumento da contratilidade miométrial, ruptura da membrana fetal e consequentemente parto prematuro (Paige *et al.*, 1998; Madianos *et al.*, 2001; Scannapieco *et al.*, 2003; Pizzo *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2006; Pretorius *et al.*, 2007).

Por outro lado, a associação entre bactérias cariogênicas e gestação é pouco descrita. No Brasil, a cárie representa um grande problema de saúde pública e medidas de prevenção precoces devem ser empregadas logo após o nascimento, especialmente contra a colonização por *Streptococcus mutans* (SM), que é considerado com agente etiológico primário da cárie

dental (Loesche, 1975), já que muitas crianças brasileiras, entre 5 e 11 meses, apresentam altos níveis de SM detectáveis na saliva (Alves *et al.*, 2009).

S. mutans possui várias propriedades de virulência que possibilitam sua sobrevivência em ambientes ácidos inóspitos para outros tipos de bactérias. A sua capacidade de adesão e acúmulo em superfícies rígidas, como os dentes, formando biofilmes dentários e sua habilidade em metabolizar carboidratos e sobreviver em locais de pH baixo, compõem fatores chaves dos seus mecanismos de virulência (Wen *et al.*, 2015). Este micro-organismo produz, pelo menos, três tipos diferentes de glucosiltransferases (Gtfs), subdivididas em Gtf B, C e D. Estas Gtfs podem ser solúveis ou insolúveis e utilizam a sacarose para produzir glucanos que são exopolímeros de glicose e quando combinadas com proteínas de ligação de glucano (Gbps), favorecem a coesão e aglutinação de estreptococos cariogênicos na superfície dos dentes (Sumei *et al.*, 2014). As proteínas ligantes do glucano se dividem em; GbpA, GbpB, GbpC e GbpD e são de extrema importância para que ocorra o acúmulo de SM na presença de sacarose, pois de acordo com os autores a superfície celular da bactéria se liga á matriz dos glucanos que foram produzidos pelas Gtfs (Banas *et al.*, 2007, Banas *et al.*, 2003).

Alguns estudos têm demonstrado que mães com elevadas concentrações de SM salivares, tendem a ter filhos altamente infectados (Berkowitz *et al.*, 1975, Köhler *et al.*, 1983; Li *et al.*, 1995; Redmo *et al.*, 2001), pois a mãe pode representar a fonte primária de infecção (Caufield *et al.*, 1989).

As primeiras informações a respeito da possível transferência de bactérias envolvidas no biofilme dentário foram relatadas por Ivanyi e Lehner (1978) que constataram uma correlação significativa antígeno-específica existente entre as respostas proliferativas de linfócitos maternos e neonatais para uma variedade de antígenos bacterianos do biofilme dental. Os autores sugeriram que os linfócitos fetais estavam sendo sensibilizados por um fator materno solúvel que atravessa a placenta. Posteriormente, *Streptococcus mutans* e

Lactobacillus casei foram detectados na cavidade amniótica (Bearfield *et al.*, 2002; Dasanayake *et al.*, 2005; Morency *et al.*, 2006).

A disseminação de bactérias orais pela corrente circulatória é comum em pacientes submetidos a procedimentos dentais como exodontias, tratamento endodôntico e cirurgia periodontal (Li *et al.*, 2000). Em gestantes a entrada de micro-organismos para a circulação seria facilitada pelos quadros de gengivites (Nierderman *et al.*, 2013) devido as alterações hormonais decorrentes da gravidez (Offenbacher *et al.*, 2006). Somados a isto, além da capacidade de formação do biofilme dental, SM pode estar associado à etiologia das endocardites bacterianas, devido a sua capacidade de causar uma bacteremia seguida pela adesão às células endoteliais (Kilian, 1982; Moreillon, 2004; Nakano *et al.*, 2006; Nakano *et al.*, 2006, Nemoto *et al.*, 2008).

Neste sentido, as evidências literárias fortalecem a hipótese de que possa haver influxo de espécies bacterianas orais ou parte destas, por via hematogênica durante a gestação. Este estímulo bacteriano pode desempenhar um papel fundamental na estimulação ativa do sistema imune de mucosa de recém-nascidos e lactentes, tendo uma função biológica importante por apresentar uma coleção de antígenos que contribuem para a tolerância antigênica (Zaura *et al.*, 2014) e também pode ser uma importante ferramenta para o entendimento da presença de anticorpos salivares específicos contra estreptococos orais encontrados, em recém nascidos, logo no primeiro dia de vida (Borges *et al.*, 2015).

2. HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é a de que as amostras de sangue periférico e do cordão umbilical apresentam DNA de SM proveniente da colonização oral materna.

3. OBJETIVOS

O presente estudo visa analisar a presença de material genético de SM em amostra de sangue periférico, associar com a colonização oral de puérperas de boa saúde geral e oral e verificar se há transferência de SM através do cordão umbilical para o feto.

3.1 Objetivos específicos

- Realizar ensaios de PCR em tempo real com primers específicos para SM em amostras de sangue periférico, cordão umbilical e saliva materna;
- Comparar a presença e ausência do micro-organismo nas amostras coletadas;
- Avaliar os dados clínicos gerais e orais do questionário e os dados laboratoriais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento do estudo

Um total de 83 gestantes foram incluídas neste estudo, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) com direito de interrupção em qualquer momento do estudo. O Comitê de Ética do HC-FMRP/USP de Ribeirão Preto (Anexo 1) aprovou a realização deste estudo, sob o protocolo de nº 13290/2010. Os critérios de inclusão foram: mães saudáveis e partos a termo, há menos de 24 horas, realizados na MATER (Centro de Referência em Saúde da Mulher do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto). Os critérios de exclusão foram: qualquer intercorrência na gestação ou parto e o uso de medicamentos que interferissem na lactação. Foi realizada uma entrevista com preenchimento do questionário no primeiro dia de internação hospitalar (Anexo 2). Das 83 gestantes que assinaram o TCLE e participaram do estudo foram obtidas amostras sanguíneas (SP e SC) de todas. No entanto, destas voluntárias, 64 coletas salivares puderam ser analisadas devido à suficiência de volume necessário para a realização da extração de DNA. Assim, as análises comparativas com os dados de sangue e salivares foram realizadas para este subgrupo.

4.2. Coleta de amostras

As coletas do sangue periférico (SP) e salivares (SA) foram realizadas no período matutino no dia de admissão no hospital, enquanto que, as amostras de sangue do cordão umbilical (SC) foram coletadas logo após o parto.

A coleta do sangue do cordão umbilical foi realizada imediatamente após a secção do cordão e dequitação quando então a placenta foi colocada sobre um suporte vazado com cerca de 30 cm de altura. Após a realização da antissepsia do cordão umbilical, a veia

umbilical foi puncionada com "scalp" flexível e o sangue coletado em seringas de 50 ml contendo anticoagulante.

As salivas não estimuladas foram obtidas pela sucção com pipetas estéreis Pasteur e colocadas em tubos eppendorfs imersos em gelo. Após as coletas, as amostras foram transportadas em gelo para análises e processamentos nos Laboratórios de Biopatologia e de Microbiologia da UNIUBE e Laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. As amostras foram centrifugadas a 1.300 g e armazenadas a -80°C até a realização dos ensaios.

4.3. Detecção de SM nas amostras biológicas

4.3.1. Extração de DNA cromossomal bacteriano

Primeiramente as amostras foram tratadas com solução de lisozima para rompimento de parede celular. A partir de então as amostras foram submetidas à extração do DNA de acordo com o protocolo do fabricante do kit PowerLyzer® PowerSoil DNA Isolation (Mobio, California, EUA) conforme esquematizado na Figura 1. As amostras, antes de terem o DNA extraído, foram tratadas com lisozima (Sigma, Missouri, EUA) e posteriormente receberam 750µL de solução *bead* juntamente com mais 60 µL da solução C1 e foram agitadas em vortex para homogeneização e transferidas para centrifuga a 10.000 g por 30 segundos em temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo em que foi aplicado 250µL de C2 que foi agitado e incubado a 4°C por 5 minutos. Após a centrifugação em temperatura ambiente por 1 minuto a 10.000 g foi retirado o sobrenadante e adicionado 200µL de solução C3. Em seguida, o eppendorf foi levado ao vórtex brevemente e incubado à 5 minutos por 4°C. As amostras foram novamente centrifugadas em temperatura ambiente por 1 minuto a 10.000g.

Ao sobrenadante obtido foram adicionados 1200 µL de tampão C4 e o eppendorf foi levado por 5 segundos ao vórtex. Foram transferidos para um novo tubo com filtro (Mobio)

675 μL do sobrenadante que se formou em seguida o conteúdo foi levado a centrifuga a 10.000 g por 1 minuto até que o sobrenadante fosse filtrado através do filtro. O volume filtrado foi desprezado e foram adicionados 500 μL da solução C5 e centrifugado a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000g. Para finalização do processo, o eppendorf foi centrifugado sem nenhum líquido adicional, apenas contendo o material genético aderido à membrana, a fim que o DNA bacteriano pudesse atravessar o filtro, após este passo, o conteúdo genético foi transferido para um novo eppendorf e em seguida adicionado 100 μL da solução C6 e levado a centrifuga em temperatura ambiente a 10.000 g por 30 segundos. Após a centrifugação o filtro foi descartado, o material genético que atravessou a membrana foi preservado, restando ao final do processo 100 μL de DNA pronto para uso.

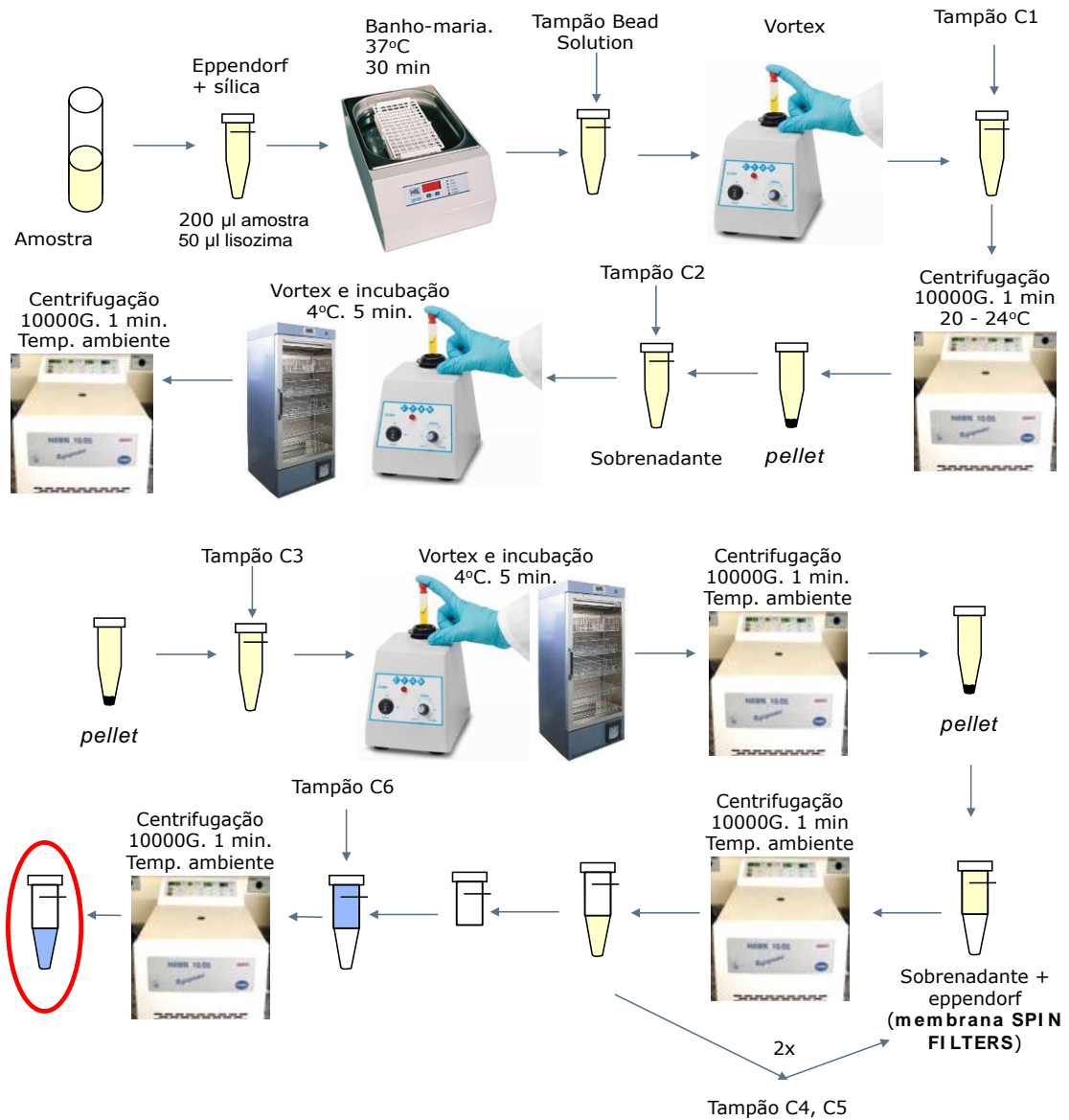


Figura 1. Representação esquemática do processo de extração do DNA cromossomal kit PowerLyzer® PowerSoil DNA Isolation.

4.3.2 Quantificação do DNA extraído

Após extração do DNA das amostras foi realizada a quantificação de material genético extraído bem como seu grau de pureza. Para isto 2µL da amostra foi analisado em Espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA). A pureza das extrações das amostras foi considerada adequada quando razão entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm apresentavam valores entre 1.8 e 2.0. Para valores fora deste intervalo as

extrações foram descartadas e repetidas, já que valores maiores que este intervalo indica contaminação por RNA e abaixo sugerem a presença de proteínas (Sambrook *et al.*, 1989).

4.3.3. PCR em tempo real (PCR-RT) das amostras

Os ensaios de PCR-RT das amostras foram comparados a dois iniciadores que asseguraram a reatividade e/ou negatividade, através da realização dos ensaios com DNA extraído de cepas de *S. mutans* (UA159), como controle positivo e água ultrapura livre de qualquer tipo de DNA, como controle negativo.

Para os experimentos foram utilizados os primers de oligonucleotídeos para SM (Exxtend Biotecnologia, São Paulo, Brasil), como descritos por Yano *et al.*, (2002) e demonstrado na Tabela 1. Os oligonucleotídeos foram previamente dissolvidos em TE 1X [10 mM tris-HCL. EDTA 1mM (pH 7.5-8.0)].

<i>Bactéria</i>	<i>Orientação</i>	<i>Sequência</i>	<i>Nº de bases</i>
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	<i>Forward</i>	5' AGCCATGCGCAATCAACAGGTT 3'	31
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	<i>Reverse</i>	3' CGCAACGCGAACATCTTGATCAG 5'	32

Tabela 1. Apresentação da bactéria, orientação, sequência dos pares de bases e números de bases dos oligonucleotídeos (Yano *et al.*, 2002).

Para a realização da técnica de PCR-RT, foi utilizado um mix contendo: 6,5 µL de 1X Sybr green master mix (Roche, Ilhois, EUA), 1µL de cada primer (Tabela 1), 4,5 µL de água ultrapura livre de DNA e 2µL de amostra de DNA cromossomal. Em seguida, este mix foi depositado em uma placa de 96 poços MicroAmp® (Thermo Fisher Scientific) que foi selada adequadamente, levada para um "speed" de 2 segundos e colocada no termociclador.

O termociclador, StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) foi programado para obter uma desnaturação do DNA a uma temperatura de 95°C por um período de 10 minutos, o anelamento ocorreu a 62°C por 20 segundos e o processo de extensão a 68°C por 40 segundos, todo o processo de termo ciclagem se deu em 40 ciclos consecutivos sendo que o ciclo final compreendeu em média o intervalo entre 75°C a 85°C (Yano *et al.*, 2002).



Figura 2: StepOne™ Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific. Termociclador utilizado para realização dos testes de PCR-RT.

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

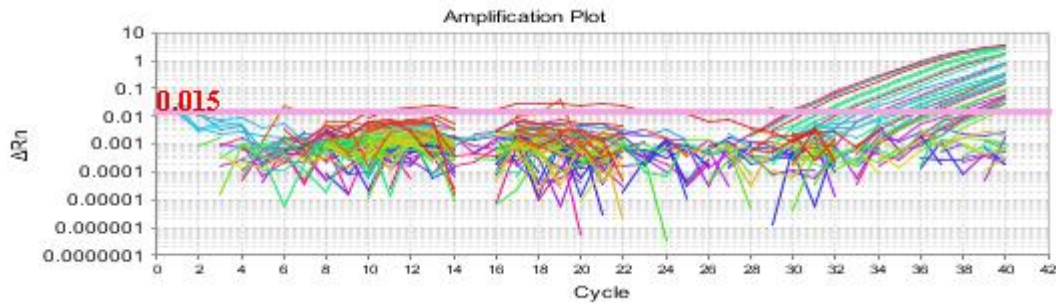


Figura 3: Curva de Amplificação do PCR-RT. Representação da especificidade da reação.

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

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações das frequências de amostras com positividade para SM foram comparadas entre si pelo teste do qui-quadrado. O valor de concentração de DNA de cada amostra foram comparados e analisados por ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As correlações entre presença de DNA entre as amostras e os dados obtidos pelos questionários foram testadas por análise de correlação de Pearson. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1. Análise comparativa da detecção de SM em amostras de SP e SC e dos dados obtidos nos questionários

As frequências de detecções positivas e negativas de SM no SP e SC (Tabela 2), analisadas individualmente e comparadas entre si, mostraram que a maioria das amostras (acima de 50%) apresentam DNA de SM detectável através do PCR-RT. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre as frequências de SP e SC positivas e negativas (Tabela 2, Qui-quadrado, $p=0.75$, $q=0.098$), mas houve uma correlação positiva na detecção de SM entre SP e SC (Pearson, $p=0.0001$, $r=0.41$).

Detecção	SP	SC	SP e SC
SM	(n=83)	(n=83)	(n=83 pares)
Positiva n(%)	48 (58)	46 (55)	35 (42)
Negativa n(%)	35 (42)	37 (45)	24 (29)

Tabela 2. Frequência de detecção positiva e negativa nas amostras de SP e SC individualmente e no par.

Setenta e um por cento dos pares de amostras apresentaram a mesma frequência de detecção, ou seja, foram ambas positivas e negativas para SM em 35 (42%) e 24 (29%) pares respectivamente (Tabela 2). Outros 24 pares de amostras de SC e SP, cerca de 29%, não apresentaram a mesma frequência de detecção, ou seja, enquanto uma foi positiva a outra negativa. Destas amostras, não houve uma positividade maior e diferente para

determinado tipo de sangue, já que, 13 amostras de SP positivas tiveram SC negativas, enquanto que 11 de SC positivas tiveram SP negativos ($p > 0.05$).

As concentrações de DNA obtidas nas amostras mostraram que a média em SP ($n=48$) foi de $30.89 (\pm 6.69)$ e em SC foi $24.72 (\pm 14.19)$. Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração média de DNA detectado nos pares de amostras que apresentaram resposta positiva em ambas as amostras ($n=35$) para SM (média= 32.49 ± 3.49 e 30.42 ± 5.80 , respectivamente para SP e SC, $p=0.076$). Também os valores de concentração deste grupo estiveram correlacionados (Pearson, $p < 0.001$, $r=0.62$).

Os dados coletados através do questionário (Figura 4) mostraram que a maioria das amostras foram de gestantes da raça branca ($n=47$), com 2º grau completo ($n=55$) e que tiveram parto vaginal ($n=54$).

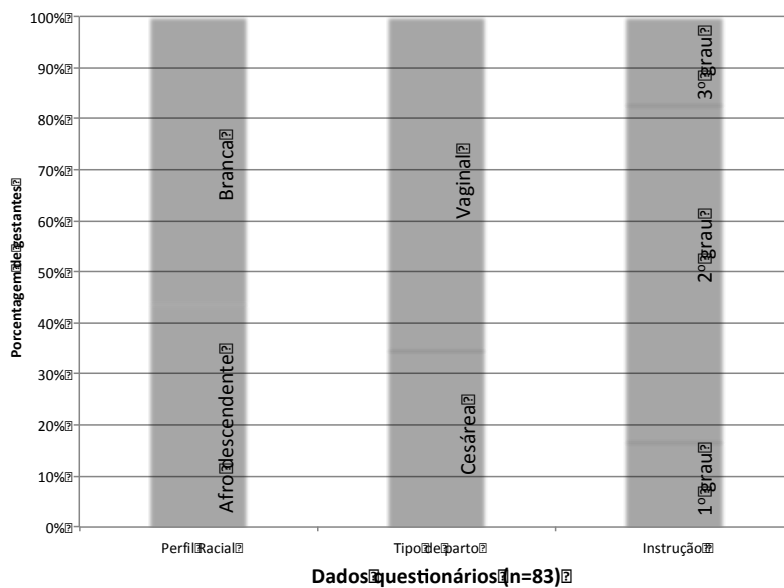


Figura 4: Dados do questionário social utilizado no estudo. Dividido de acordo com a raça, tipo de parto e grau de instrução.

A análise de frequência das amostras de sangue positivas e/ou negativas para SM ($n=83$) e dados do questionário mostrou que não foi encontrada associação entre a frequência de detecção de SM positiva com os dados socioeconômicos e de saúde obtidos através do inventário de saúde (Tabela 3), tais como: o perfil racial, escolaridade, tipo de

parto (cesárea ou vaginal) e idade gestacional ($p>0.05$, $r<0.21$) para as amostras de SP ($n=48$) e nem mesmo para os pares de SP e SC positivos ao mesmo tempo ($n=35$). Para o grupo de amostras positivas de SC ($n=46$) também não foi encontrada correlação com a maioria dos dados coletados no questionário, com exceção do perfil racial, em que a raça branca esteve mais correlacionada à presença de SM detectável do que as gestantes afrodescendentes (Pearson, $p=0.002$, $r=0.24$).

Houve diferença significativa em relação ao perfil racial das amostras de SC (Tabela 3), ou seja, voluntárias da cor branca tiveram maior frequência de amostras positivas para SM do que as afrodescendentes (Qui-quadrado, $p=0.001$, $q=11.59$). Os resultados também mostraram que o tipo de parto não mostrou diferenças na detecção de SM no SC e SP (Qui-quadrado, $p>0.057$, $q>0.50$).

Amostras avaliadas e detecção de SM:							
<i>Dados coletados</i>	SP		SC		SP e SC		
	+	-	+	-	+	-	≠
<i>Perfil Racial</i>							
<i>Afrodescendente</i> n(%)	18 (50)	18 (50)	15 (42) ¹	21 (58) ¹	12 (34)	15 (42)	9 (24)
<i>Branca</i> n(%)	30 (64)	17 (36)	31 (66) ¹	16 (34) ¹	23 (49)	9 (19)	15 (32)
<i>Tipo de parto</i>							
<i>cesárea</i> n(%)	14 (48)	15 (52)	15 (52)	14 (48)	10 (34)	10 (34)	9 (31)
<i>vaginal</i> n(%)	34 (63)	20 (37)	31 (57)	23 (43)	25 (46)	14 (26)	15 (28)
<i>Grau de Instrução</i>							
<i>1º grau completo</i> n(%)	5 (36)	9 (64)	8 (57)	6 (43)	3 (21)	4 (29)	7 (50)
<i>2º grau completo</i> n(%)	34 (62)	21(38)	30 (55)	25 (45)	25 (45)	16 (30)	14 (25)
<i>superior completo</i> n(%)	9 (64)	5 (36)	8 (57)	6 (43)	7 (50)	4 (29)	3 (21)

¹ Qui-quadrado, $p=0.001$, $q=11.59$

Tabela 3. Frequência e porcentagem de detecção positiva (+) e negativa (-) para DNA de SM em amostras de SP e SC de acordo com os dados coletados no questionário aplicado.

De acordo com as análises dos dados coletados de saúde oral, todas as 83 gestantes frequentavam o dentista, sendo que, 41% realizaram tratamento odontológico durante a gravidez, 61% escovavam os dentes mais de 3 vezes ao dia e 43% apresentavam sangramento gengival durante a técnica de escovação. Não foram encontradas correlações entre os dados de saúde oral e detecção de SM (Pearson $p>0.05$) e também não houve diferenças entre estes dados e as amostras positivas ou negativas de SP e SC (Qui-quadrado, $p>0.07$, $r>0.54$).

6.2. Comparação da detecção de SM na SA e em amostras de SP e SC

Os resultados das amostras que foram comparadas com a saliva ($n=64$) mostraram que não houve correlação significativa entre presença de SM na saliva (SA) com SP (Pearson $p=0.53$, $r=0.079$) e nem com SC ($p=0.54$, $r=0.0076$). As análises de frequência de detecção de SM nas amostras de SP, SC e SA (Tabela 4) mostraram que das amostras salivares positivas para SM ($n=28$), 17 foram positivas para SP e a mesma frequência para SC. Treze conjuntos de amostras (cerca de 46.4%) apresentaram positivamente SM ao mesmo tempo. Trinta e seis amostras de saliva não apresentaram SM detectável, interessantemente, 19 amostras de SP e de SC apresentaram tal bactéria, sendo que a maioria destas ($n=15$) apresentaram SM em SP e SC ao mesmo tempo. Por outro lado, algumas salivas apresentaram SM detectável, mas as amostras de sangue (SP e SC) não apresentaram detecção de SM ($n=11$).

	SP		SC		SC e SP	
SA	+	-	+	-	+	-
	n=36	n=28	n=36	n=28	n=28	n=20
+	17	11	17	11	13	7
n=28						
-	19	17	19	17	15	13
n=36						

Tabela 4. Frequência de detecção positiva (+) e negativa (-) para DNA de SM em amostras de SP e SC de acordo com os a detecção de SM em amostras de salivas maternas (SA).

Os dados no questionário no subgrupo de 64 amostras pareadas mostraram que não houve diferenças entre o tipo de parto e detecção de SM em nenhuma das amostras (Qui-quadrado, $p > 0,88$, $q < 0,321$).

A frequência de detecção de SM nas amostras de SA, SC e SP de acordo com os dados de saúde oral, obtidos através de entrevista com as mães (Tabela 5) mostrou que não houve diferença entre gestantes que realizaram tratamento odontológico durante a gestação e frequência de SM detectável ou não nas amostras (Qui-quadrado, $p > 0,52$, $q < 1,28$). No entanto, houve diferença significativa nas gestantes que não fizeram tratamento odontológico durante a gestação na frequência de detecção de SM entre SA e SC (Qui-quadrado, $p = 0,04$, $q = 4,50$).

<i>Dados Coletados Saúde Oral</i>	n	SA		SC		SP		SA e SP			SA e SC			SA e SP e SC		
		+	-	+	-	+	-	+	-	≠	+	-	≠	+	-	≠
<i>Tratamento odontológico durante a gravidez (n)</i>	24	11	13	14	10	13	11	7	7	10	7	6	11	6	5	13
<i>%</i>	38	46	54	58	41	54	46	29	29	42	29	25	46	25	21	54
<i>sem tratamento (n)</i>	40	17	23	22	18	23	17	10	10	20	10	11	19	7	8	25
<i>%</i>	64	43 ^a	57 ^a	55 ^a	45 ^a	58	42	25	25	50	25	28	47	18	20	62
<i>Frequente o dentista (n)</i>	64	28	36	36	28	36	28	17	17	30	17	17	30	13	13	38
<i>%</i>	100	44	56	56	44	56	56	27	27	46	27	27	46	20	20	60
<i>Escovação ao dia 1 a 2 vezes (n)</i>	23	13	10	11	12	12	11	8	6	9	7	6	10	5	6	12
<i>%</i>	36	56 ^b	44 ^b	48	52	52	48	35	26	39	30	26	44	22	26	52
<i>acima de 3 vezes (n)</i>	41	15	26	25	16	24	17	9	11	21	10	11	20	8	7	26
<i>%</i>	64	37 ^{b,c,d}	63 ^{b,c,d}	61 ^c	39 ^c	58 ^d	42 ^d	22	27	51	24	27	46	20	17	63
<i>sangramento gengival positivo (n)</i>	27	9	18	13	14	12	15	5	11	11	5	10	12	4	8	15
<i>%</i>	42	34	66	48	52	44	56	18	41	41	16	37	47	15	30	55

^a Qui Quadrado, P=0.04, q=4.5

^b Qui Quadrado, P=0.01, q=7.2

^c Qui Quadrado, P=0.001, q=11.5

^d Qui Quadrado, P=0.004, q=8.8

Tabela 5. Frequência de detecção positiva (+) e negativa (-) para DNA de SM em amostras de SP e SC e SA de acordo com os dados de saúde oral das 64 amostras pareadas.

Quanto à escovação, gestantes que afirmaram escovar mais de três vezes ao dia apresentaram um menor número de amostras de SA com SM detectável do que aquelas que escovavam de 1 a 2 vezes ao dia (Tabela 5, Qui-quadrado, $p=0.01$, $q=7.25$), o que não pode ser observado nas amostras de SP e SC (Qui-quadrado, $p>0.08$, $q<3.40$). Quando se compara os grupos de amostras SA e SP e SA com SP nas gestantes, que escovam 1 vez ao dia, não há diferenças na detecção de SM (Qui-quadrado, $p>0.32$, $q<1.26$). Por outro lado, as gestantes que escovam mais de 3 vezes apresentam menos SM detectável na saliva, mas é mais frequente a positividade de SM nas amostras de sangue (Qui-quadrado, $p<0.00046$, $q>8.846$), o que também foi encontrado nas amostras totais de sangue (Qui-quadrado,

$p < 0.002$, $q > 8.345$). Não foi encontrada diferenças entre as amostras e sangramento gengival positivo (Qui-quadrado, $p > 0.06$, $q < 4.05$).

7. DISCUSSÃO

O presente estudo buscou analisar a presença e a ausência de material genético de SM em amostras de sangue periférico e do cordão umbilical e comparar com amostras salivares maternas e dados socioeconômicos e de saúde das gestantes. Os resultados revelaram que há transferência de DNA de SM do SP para SC independente da presença da bactéria em amostras salivares maternas e parte das amostras analisadas com SM detectável eram derivadas de crianças submetidas a cesariana. Estes resultados refutam a ideia de que o ambiente intrauterino seja estéril e que os fetos adquirem micro-organismos somente quando iniciavam o trânsito pelo canal vaginal e posteriormente pelo contato com a pele materna (Tissier *et al.*, 1900; Mackie *et al.*, 1999). Estes resultados corroboram com os estudos recentes já que vários micro-organismos puderam ser isolados em amostras de sangue de cordão umbilical, líquido amniótico e nas membranas fetais, sem qualquer evidência clínica ou histológica de infecção ou inflamação nos pares de mães-filhos (Bearfield *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2005; Steel *et al.*, 2005; Funkhouser *et al.*, 2013; Stout *et al.*, 2013, Aagaard *et al.*, 2014). Assim como no presente estudo, existem outros que confirmem a presença de bactérias orais nos tecidos e substâncias fetais, especialmente as associadas à doença periodontal, tais como *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus spp* de mulheres que tiveram partos prematuros (Bearfield *et al.*, 2002).

A boca é o local do corpo com maior diversidade bacteriana, sendo muito maior que a microbiota da vagina ou do intestino, pois alberga muitas espécies bacterianas identificadas (Parahitiyawa *et al.*, 2010). Não foram encontradas associações entre o tipo de parto e presença de micro-organismo nas amostras sanguíneas analisadas, o que era esperado, pois SM é um micro-organismo colonizador da cavidade bucal e não vaginal o que

fortalece a ideia de que a presença de SM no SC reflete a presença de SM na circulação materna como fruto da microbiota oral.

Reconhecidamente, SM é um micro-organismo comum na microbiota bucal e está associado à formação da cárie dentária (Alves *et al.*, 2009). Como a cárie é uma doença multifatorial, nem sempre o indivíduo que alberga a bactéria na cavidade oral, tem ou está com a doença. SM pode ser um micro-organismo transitório na cavidade bucal, o que justifica a não detecção de SM nas salivas de puérperas que apresentaram DNA microbiano no SP e no SC.

Inusitadamente, estudos têm demonstrado que as bactérias precursoras na colonização fetal advêm da boca enquanto o bebê ainda é envolvido pelo âmnio (Palmer *et al.*, 2007). Estudos de sequenciamento genético demonstraram que o microbioma do bebê é geneticamente mais semelhante à microbiota oral materna do que a vaginal ou intestinal (Stout *et al.*, 2013; Aagaard *et al.*, 2014; Prince *et al.*, 2014). Diante disto, a colonização mais precoce frequentemente observada na população brasileira (Alves *et al.*, 2008) e a presença de IgA específico a SM em amostras salivares de recém nascidos (Borges *et al.*, 2015), poderiam ser devido a esta exposição durante a vida intrauterina.

A análise de correlação entre as amostras de sangue, quanto a detecção positiva ou negativa de SM, mostrou que 75% dos pares de SP e SC apresentaram a mesma detecção SM, sendo ela positiva ou negativa. Os níveis de concentração de SM também foram parecidos entre as amostras sanguíneas, o que permite sugerir que a transferência ou não de SM ocorre do SP para SC. Desta maneira, a presença de SM nas amostras de SP podem atravessar a membrana amniótica e atingir a circulação do fetal.

Os dados coletados de saúde oral sobre o número de escovações realizadas durante o dia, mostraram que quanto maior o número de escovações (mais de 3 vezes ao dia) menor é a frequência de detecção de SM na saliva. Por outro lado, estas mesmas mulheres,

apresentaram maior detecção de SM no SC e SP, sugerindo que o trânsito de bactérias salivares pode ser resultados da escovação nesta gengiva permeável, embora o sangramento gengival durante a escovação não se correlacionou com a presença de SM no SP. Também a ausência de tratamento odontológico durante a gestação, não aumenta a frequência de detecção de SM na saliva, mas sim nas amostras de SC. Há de se considerar que a detecção de material genético, com a utilização dos ensaios de PCR em tempo real utilizados no presente estudo, não diferenciam micro-organismos vivos, mortos ou fragmentos bacterianos, mas foram eficientes para detecção de DNA de SM nas amostras de saliva e sangue, bem como no controle positivo. Tal como acontece com outras interfaces no nosso corpo, há uma batalha constante entre estas bactérias, a integridade do tecido e o sistema imunológico que trabalham para impedir que essas bactérias entrem nos corpos (Kliman, 2014), mas pode ser que ocorra uma bacteremia transitória de SM, já que este micro-organismo tem fatores de adesão endotelial como descritos das endocardites (Nemoto *et al.*, 2008) ou mesmo que estes fragmentos de SM sejam transportados para a circulação materna, atingindo o SP.

Os relatos na literatura mostram que mulheres grávidas podem ter um aumento de sangramento gengival ocasionado pela gengivite devido a um aumento do tecido gengival com sangramento e intercâmbio da boca com o ambiente vascular o que possibilita o acesso das bactérias orais da mãe para o sangue e posteriormente para placenta (Niederman, 2013). Jeurink e seus colaboradores (2013) sugeriram um mecanismo semelhante para a formação da microbiota leite materno, que envolve a educação de células imunes pelo hormônio progesterona, comum na gravidez, resultando no transporte de bactérias da mãe para suas glândulas mamárias (Jeurink *et al.*, 2013).

O mecanismo usado pelas bactérias orais provenientes de gestantes para transferência para a circulação fetal atravessando a placenta ainda não está totalmente esclarecido. Há uma hipótese de que as células dendríticas da cavidade oral carregem as

bactérias orais para os tecidos linfáticos da placenta, desde a placa de Peyer até os nódulos linfáticos mesentéricos (Donnet-Hughes *et al.*, 2010). Ao chegarem aos tecidos linfáticos, estas células dendríticas, conhecidas como células apresentadoras de antígenos (APCs- *Antigen Presenting Cells*), podem sofrer diapedese e atravessar células endoteliais para o tecido linfático (Jhonson *et al.*, 2014). Ao adentrarem nos tecidos linfáticos, as APCs podem carregar consigo bactérias e outros agentes patógenos e por este mecanismo mediar a apresentação entre bactérias e linfócitos. Estas células dendríticas podem ser carreadoras ativas de micro-organismos podendo migrar para o tecido placentário e contaminar o feto (Collantes-Fernandez *et al.*, 2012), pois as APCs facilitarão o acesso deste micro-organismo até o feto, como pode ser observado em casos de infecção fetal por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em camundongos (Barragan *et al.*, 2002).

Portanto, o presente estudo, por meio da análise dos dados aqui mostrados, vem reforçar a teoria de que há bactérias ou parte delas circulantes no sangue periférico e sangue do cordão umbilical, sem causar bacteremia transitente ou interrupção da gestação precocemente e que há um caminho no qual, bactérias da cavidade oral podem se tornar as primeiras colonizadoras do feto, antes mesmo da membrana amniótica ser rompida.

Através da observação e comprovação da existência de um influxo microbiano ou parte de SM entre os pares mãe/filho, observados durante esta pesquisa, este estudo abre uma gama de discussões sobre o mecanismo de transferência de micro-organismos orais detectáveis entre mãe e feto, o que poderia contribuir para instalação desta bactéria no neonato ou mesmo estimular uma resposta imunológica contra a sua instalação.

8. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que a maioria das amostras de sangue possuem SM detectável, mostrando que bactérias orais podem ser transferidas durante a vida intra-uterina e que a presença de SM no SC está correlacionada com a detecção de SM no SP,entretanto a detecção de SM no sangue, seja periférico ou umbilical não se correlaciona com a detecção na saliva e os resultados também apontaram que medidas de higiene oral como a escovação, podem minimizar a detecção de SM na saliva, mas aumentar no sangue, provavelmente devido a maior permeabilidade das gengivas durante a gestação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AAGAARD, K.M. Author response to comment on "The placenta harbors a unique microbiome". **Science Translation Medicine**, Houston, v. 254, n. 6, p. 17-6, sep. 2014.
2. ALVES, A.C. et al. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. **Journal of Medical Microbiology**, Piracicaba, v.58, n.4, p.476-81. apr.2009.
3. BANAS, J.A.; FOUNTAIN, T.L.; MAZURKIEWICZ, J.E.; SUN, K.; VICKERMAN, M.M. *Streptococcus mutans* glucan-binding protein-A affects *Streptococcus gordonii* biofilm architecture. **FEMS Microbiology Letters**, New York, v. 267, n.1, p.80-8. feb.2007.
4. BANAS, J. A.; VICKERMAN, M. M. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, New York, v. 14, n.2, p.89-99, mar. 2003.
5. BARRAGAN, A.; SIBLEY, L.D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **The Journal of Experimental Medicine**, St. Louis, v.195, n.12, p.1625-33.jun. 2002.
6. BASSANI, D.G.; OLINTO, M.T.; KREIGER. N. Periodontal disease and perinatal outcomes: a case-control study. **Journal of Clinical Periodontology**, Pelotas, v.34, n, 1, p.31-9.jan. 2007.
7. BEARFIELD, C.; DAVENPORT, E.S.; SIVAPATHASUNDARAM, V.; ALLAKER, R.P. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. **BJOG- An international journal of obstetrics and gynaecology**, London, v.109, n.5, p.527-33, may, 2002.
8. BERKOWITZ, R.J.; JORDAN, H.V. Similarity of bacteriocins of *Streptococcus mutans* from mother and infant. **Archives of Oral Biology**, v.20, n, 11, p.725-30. nov. 1975.
9. BOGGESS, K.A.; MOSS, K.; MADIANOS, P.; MURTHA, A.P.; BECK, J.; OFFENBACHER, S. Fetal immune response to oral pathogens and risk of preterm birth. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Chapel Hill, v.193, n.3, p.1121-6.sep. 2005.
10. BOGGESS, K.A.; MADIANOS, P.N.; PREISSER, J.S.; MOISE, K.J.JR.; OFFENBACHER, S. Chronic maternal and fetal *Porphyromonas gingivalis* exposure during pregnancy in rabbits. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Chape Hill, v.192, n.5, p.554-557. feb. 2005.
11. BORGES, M.C.; SESSO, M.L.; ROBERTI, L.R.; DE MENEZES OLIVEIRA, M.A.; NOGUEIRA, R.D.; GERALDO-MARTINS, V.R.; FERRIANI, V.P. Salivary antibody response to streptococci in preterm and fullterm children: a prospective study. **Archives of Oral Biology**, Ribeirão Preto, v. 60, v.1, p. 116-125, jan.2015.

12. CALVET G. et al. Detection and sequencing of *Zika virus* from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, Rio de Janeiro, v. 3099, n.16, p-00095-5. fev. 2016.
13. CAUFIELD, P.W.; WALKER, T.M. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Birmingham, v. 27, n. 2, p. 274-8. fev. 1989.
14. COLLANTES-FERNANDEZ, E. et al. Infected dendritic cells facilitate systemic dissemination and transplacental passage of the obligate intracellular parasite *Neospora caninum* in mice. **PLoS One**, Swden, v.7, n.3, p.32123.mar.2012.
15. DASANAYAKE, A. P.; LI, Y.; WIENER, H.; RUBY, J. D.; LEE, M. J. Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. **Journal of Periodontology**, New York, v.76, n. 2, p.171-7, feb. 2005.
16. DAVENPORT, E.S. et al. Maternal periodontal disease and preterm low birthweight: Case-control study. **Journal of Dental Research**, London, v.81, n.5, p.313-8. may.2002.
17. DONNET-HUGHES, A. et al. Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. **Proceedings of the Nutrition Society**, Switzerland, v. 69, n.3, p. 407-15. ago. 2010.
18. ENDO, T. et al. Detection of congenital *cytomegalovirus* infection using umbilical cord blood samples in a screening survey. **Journal of Medical Virology**, Nagoya, v. 81, n.10, p. 1773-1776, oct. 2009.
19. FARDINI, Y.; CHUNG, P.; DUMM, R.; JOSHI, N.; HAN, Y.W. Transmission of diverse oral bacteria to murine placenta: evidence for the oral microbiome as a potential source of intrauterine infection. **Infection and Immunity**, Cleveland, v.78, n.4, p. 1789-96.apr. 2010.
20. FAVIER, C.F; VAUGHAN, E.E; DE VOS, W.M; AKKERMANS, A.D. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. **Applied and Environmental Microbiology** , Wageningen, v.68, n.1, p. 219-26. jan. 2002.
21. FUNKHOUSER, L.J; BORDENSTEIN, S.R. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. **PLOS Biology**, Nashville, v.11, n.8, p.1001-631. aug.2013.
22. IVANYI, L.; LEHNER, T. The relationship between caries index and stimulation of lymphocytes by *Streptococcus mutans* in mothers and their neonates. **Archives of Oral Biology**, v.23, n.10, p.851-6.1978.
23. JIMÉNEZ, E. et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. **Current Microbiology**, Madrid, v.51, n.4, p.270-4. sep.2005.

24. JIMÉNEZ, E. et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Research in Microbiology**, Madrid, v.159, n.3, p.187-93. apr/jan.2008.
25. JOHNSON, L.A.; JACKSON, D.G. Control of dendritic cell trafficking in lymphatics by chemokines. **Angiogenesis**, v.17, n. 2, p.335-345.apr. 2004.
26. JURETIC, K.; STRBO, N.; CRNCIC, T.B.; LASKARIN. G.; RUKAVINA, D. An insight into the dendritic cells at the maternal-fetal interface. **American Journal of Reproductive Immunology**, Rijeka, v.52, n. 6, p.350-5.dec. 2014.
27. KATZ, J.; ORCHARD, A. B.; ORTEGA, J.; LAMONT, R. J.; BIMSTEIN, E. Oral health and preterm delivery education: a new role for the pediatric dentist. **Pediatric Dentistry**, Gainesville, v. 28, n.6, p.494-8, nov/dec. 2006.
28. KILIAN, M. Systemic disease: manifestations of oral bacteria. In: McGlance JR, Michalek SM, Cassell GH, editors. **Dental microbiology**, Philadelphia, p. 832-838. 1982.
29. KLIMAN, H.J. Comment on "the placenta harbors a unique microbiome". **Science Translational Medicine**, New Haven, 17, n. 6, p. 254. sep.2014.
30. KÖHLER, B.; BRATTHALL, D.; KRASSE, B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. **Archives of Oral Biology**. v.28, n.3, p. 225–231.1983.
31. LI, Y.; CAUFIELD, P.W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. **Journal of Dental Research**, Birmingham, v.74, n.2, p.681-5. feb.1995.
32. LIAO, S. et al. *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. **Journal of Bacteriology** , USA, v. 196, n.13, p. 2355-66. jul. 2014.
33. LIN, D. et al. Porphyromonas gingivalis infection during pregnancy increases maternal tumor necrosis factor alpha, suppresses maternal interleukin-10, and enhances fetal growth restriction and resorption in mice. **Infection and Immunity**, Chapel Hill, v.71, n.9, p. 5156-62. sep.2003.
34. LOESCHE, W.J.; ROWAN, J.; STRAFFON, L.H.; LOOS, P.J. Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. **Infection and Immunity**, Michigan, v.11, n.6, p.1252-60. Jun. 1975.
35. MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **American Journal of Clinical Nutrition**, Urbana-Champaign, v. 69, n. 5, p. 1035S-1045S. may.1999.

36. MADIANOS, P.N. et al. Maternal periodontitis and prematurity. Part II: Maternal infection and fetal exposure. **Journal of Periodontology**, Chapel Hill, v.6, n.1, p.175-82.dec.2001.
37. MARTÍN, R. et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. **Journal of Pediatrics**, Madrid, v.143, n.6, p.754-758, dec. 2003.
38. MICHALOWICZ, B.S. et al. Treatment of periodontal disease and the risk of preterm birth. **New England Journal of Medicine**, Minneapolis, v.355, n.18, p.1885-1894.nov. 2006.
39. MOREILLON, P.; Que, Y.A. Infective endocarditis. **Lancet**, Switzerland, v.363, n.10, p.139-149, jan. 2004.
40. MORENCY, A. M.; RALLU, F.; LAFERRIERE, C.; BUJOLDG, E. Eradication of intra-amniotic *Streptococcus mutans* in a woman with a short cervix. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Montreal, v.28, n.10, p.898-902, oct. 2006.
41. NAKANO, K.; TSUJI, M.; NISHIMURA, K.; NOMURA, R.; OOSHIMA, T. Contribution of cell surface protein antigen Pac of *Streptococcus mutans* to bacteremia. **Microbes and Infection**, Japan, v.8, n.1, p.114-21. jan.2006.
42. NAKANO, K. et al. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Japan, v. 44, n. 9, p. 3313-7.sep.2006.
43. NEMOTO, H.; NAKANO, K.; NOMURA, R.; OOSHIMA, T. Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains isolated from the heart valve of an infective endocarditis patient. **Journal of Medical Microbiology**, Japan, v. 57, n. 7, p. 891-5. jul.2008
44. NIERDERMAN, R. Pregnancy gingivitis and causal interference. **Journal of Evidence-Based Dental**, USA, v.14, n, 14, p.107-108.dec.2013.
45. OFFENBACHER, S. et al. Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, USA, v.107, n. 1, p. 29-36.jan. 2006.
46. PAIGE, D.M.; AUGUSTYN, M.; ADIH, W.K.; WITTER, F.; CHANG, J. Bacterial vaginosis and preterm birth: a comprehensive review of the literature. **Journal of Nurse-Midwifery**, USA, v.43,n. 2, p. 83-9.mar/apr. 1998.
47. PALMER. C.; BIK, E. M.; DIGIULIO, D. B.; RELMAN, D.A.; BROWN, P.O. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLOS Biology**, United States of America, v.5, n.7, p.177. jul. 2007.
48. PARAHITIYAWA, N.B. et al. Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions. **Journal of Oral Diseases**, China, v.16, n.12, p.136-45. marc.2010.

49. PIZZO, G.; LA CARA, M.; CONTI NIBALI, M.; GUIGLIA, R. Periodontitis and preterm delivery. A review of the literature. **Minerva Stomatologica**, Italy, v. 54, n. 1-2, p.1-14, jan/fev. 2005.
50. PRETORIUS, C.; JAGATT, A.; LAMONT, R.F. The relationship between periodontal disease, bacterial vaginosis, and preterm birth. **Journal of Perinatal Medicine**, London, v. 35, n. 2, p. 93-9, 2007.
51. PRINCE, A.L.; ANTONY, K.M.; CHU, D.M.; AAGAARD, K.M. The microbiome, parturition, and timing of birth: more questions than answers. **Journal of Reproductive Immunology**, Houston, v.12, n . 9, p.104-105.oct.2014.
52. RADNAI, M. et al. A possible association between mother's periodontal status and preterm delivery. **Journal of Clinical Periodontology** , Szeged, v.33, n.11, p.791-796.sep.2006.
53. RAJAPAKSE, P.S.; NAGARATHNE, M.; CHANDRASEKRA, K.B.; DASANAYAKE, A.P. Periodontal disease and prematurity among non-smoking Sri Lankan women. **Journal of Dental Research**, Sri Lanka, v.84, n.3, p. 274–277.mar.2005.
54. REDMO EMANUELSSON, I. M.; THORNQVIST, E. Distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. **Acta odontologica Scandinavica** , Sweden, v.59, n.2, p.93–98.apr.2001.
55. ROMBALDI, R. I.; SERAFINI, E.P.; MANDELLI, J.; ZIMMERMANN, E.; LOSQUIAVO, K.P. Perinatal transmission of human *papillomavirus* DNA. **Virology Journal**, Rio Grande do Sul, v. 6, n. 21, p. 83.feb .2009.
56. SCANNAPIECO, F.A.; BUSH, R.B.; PAJU, S. Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes. A systematic review. **Annals of Periodontology**, New York, v.8, n.1, p.70-8. dec. 2003.
57. STEEL, J.H.; O'DONOGHUE, K.; KENNEA, N.L.; SULLIVAN, M.H.; EDWARDS, A.D. Maternal origin of inflammatory leukocytes in preterm fetal membranes, shown by fluorescence in situ hybridisation. **Placenta**, London, v. 26, n. 8-9, p. 672-7. sep/oct. 2005.
58. STOUT, M.J. et al. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations.**American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 208, n. 3, p. 226. mar. 2013.
59. SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Laboratory Press**,New York, v.1, n.2, p.1-1881.1989.
60. TISSIER, H. Recherches sur la Flore Intestinale des Nourrissons. (e'tat Normal et Pathologique). Paris: G. Carre and C. Naud.1900.

61. WEN, Z.T.; BITOUN, J.P.; LIAO, S. PBP1 a-deficiency causes major defects in cell division, growth and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **PLoS One**, United States of America, v.16, n. 4, p.124- 319. apr. 2015.
62. XIONG, X., BUEKENS, P., FRASER, W. D., BECK, J. & OFFENBACHER, S. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: a systematic review. **International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Louisiana, v.113, n. 2, p.135-43, feb. 2006.
63. YANO, A.; KANEKO, N.; IDA, H.; YAMAGUCHI, T.; HANADA, N. Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, Tokyo, v. 217, n. 1, p. 23-30, nov.2002.
64. ZAURA, E.; NICU, E.A.; KROM, B.P.; KEIJSER, B.J. Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Netherlands, v. 26, n. 4, p. 85. jun. 2014.



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

www.hcrp.usp.br



Ribeirão Preto, 16 de março de 2011

Ofício nº 850/2011
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

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

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

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

Atenciosamente.


DR^a MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

RUCHELE DIAS NOGUEIRA

PROF^a. DR^a. VIRGÍNIA PAES LEME FERRIANI(Supervisora)

Depto. de Puericultura e Pediatria

QUESTIONÁRIOPrematuro: Não Sim

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

DADOS MATERNOS

1. Perfil racial: 1. () branco 2. () negro 3. () mulato 4. () amarelo 5. () índio 6. () outros _____
2. Grau de instrução da mãe: 1. () sem escolaridade 2. () 1º grau completo 3. () 1º grau incompleto
4. () 2º grau completo 5. () 2º grau incompleto 6. () superior
3. Renda familiar: R\$ _____/mês
4. Qual foi o tipo de parto? 1. () cesária 2. () normal
5. Qual o tempo de gestação? _____ semanas
6. Complicações durante gravidez? 1. () Sim 2. () Não Se sim, pq?

7. Realizou Pré-Natal? 1. () Sim 2. () Não Se sim, qual número de consultas?

8. Utilizou-se de medicação durante a gestação? 1. () Sim 2. () Não Se sim, o motivo? _____
9. Freqüenta regularmente o dentista? 1. () Sim 2. () Não Se sim, quando foi a última?

10. Apresenta dor em algum dente? 1. () Sim 2. () Não Qual?

11. Quantas vezes você escova os dentes por dia? () 1 () 2 () 3 () 4 ou mais
12. Seus dentes sangram durante a higiene? 1. () Sim 2. () Não
13. Possui próteses dentais? 1. () Sim 2. () Não Tipo:

DADOS DA CRIANÇA RECÉM NASCIDA

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