UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Puericultura e Pediatria

MARIA LÚCIA TALARICO SESSO

Análise dos níveis de imunoglobulinas, interleucinas e colonização bacteriana em amostras salivares nos primeiros meses de vida em nascidos a termo e pré-termo.

Ribeirão Preto

2012

MARIA LÚCIA TALARICO SESSO

Análise dos níveis de imunoglobulinas, interleucinas e colonização bacteriana em amostras salivares nos primeiros meses de vida em nascidos a termo e pré-termo.

Dissertação apresentada para Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção de título de mestre em Saúde da Criança e do Adolescente.

Área de concentração: Puericultura e Pediatria

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

Ribeirão Preto

2012

Nome: SESSO, Maria Lúcia Talarico.

Título: Análise dos níveis de imunoglobulinas, interleucinas e colonização bacteriana em amostras salivares nos primeiros meses de vida em nascidos a termo e pré-termo.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Dinah Talarico Sesso e José Antônio Sesso (*in memoriam*) pelo amor, dedicação, exemplo de vida e apoio incondicional ao longo do período de estudo e trabalho.

Aos meus irmãos, Célia Regina Talarico Sesso e Oswaldo José Talarico Sesso pelo apoio nas horas de dificuldade e carinho durante a execução desse trabalho.

Aos meus sobrinhos, Leonardo Sesso Lopes e Fernando Sesso Ferrari por me mostrarem a alegria das novas descobertas.

Ao meu noivo, Maurício Prado Sartori pelo companheirismo de todas as horas, apoio incondicional e compreensão pela minha ausência.

A minha orientadora e amiga, Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins por ter acreditado em mim e no meu trabalho me dando a oportunidade de aprender novos ensinamentos e trilhar um novo caminho em minha carreira.

A Profa. Virginia Paes Leme Ferriani pelo apoio, dedicação e ensinamentos dados durante todos esses anos de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de São Paulo, por meio do Reitor Prof. Dr. João Grandino Rodas e vice-reitor Hélio Nogueira da Cruz.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- FMRP/USP, por meio do Diretor Prof. Dr. Benedito Carlos Maciel, pela oportunidade cedida.

À Coordenadoria de Pós-Graduação da FMRP/USP, na pessoa do Coordenador Prof. Dr. Vahan Agopyan, pela oportunidade na realização do trabalho.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, na pessoa da Profa. Dra. Heloisa Bettiol, e das secretárias, Sandra Eugenio Oliveira, Ana Lucia Takaasi, Claudia Mendes, Dulcides Boleta da Silva, Vera Lucia de Andrade Hamanaka pela organização exemplar do curso, disponibilidade e competência.

Ao Prof. Dr. Sergio Pereira da Cunha, coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP/USP pela concessão na aprovação para realização da pesquisa.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação da FMRP/USP do departamento de Puericultura e Pediatria pelas suas experiências e ensinamentos.

À Profa. Dra. Virgínia Paes Leme Ferriani, pela amizade, bondade e confiança sempre depositada em mim, me ensinando a magia da pesquisa.

À Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins, pela amizade, orientação e valiosa ajuda nos momentos iniciais de execução dos experimentos.

Aos professores do The Forsyth Institute, Boston, Estados Unidos, Prof. Dr. Sigmound Socransky (*in memoriam*) e Prof. Dr. Daniel James Smith pela atenção, incentivo e ensinamentos.

Aos funcionários do The Forsyth Institute, Boston, Estados Unidos, em especial, a Dra. Flávia Teles pela sua paciência, carinho e hospitalidade com que me recebeu durante meu estágio no exterior.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação da Saúde da Criança e do Adolescente, Mariana Loureiro Castro Borges e Curi, Letícia Ferro Leal, Patrícia Volpon Santos Atique, Camila dos Santos Alvim, pela companhia, ajuda e exemplos de dedicação.

À técnica de laboratório, Luciana Rodrigues Roberti pela companhia diária, pelo seu dinamismo e amizade.

Ao estatístico Davi Caseli Aragon pelo auxílio nas análises dos dados estatísticos.

Aos meus sogros José Laércio Sartori e Vera Prado Sartori pelo apoio, generosidade e pela dedicação a sua família.

Aos meus cunhados, Letícia Prado Sartori, Rafael Prado Sartori, Flávio Augusto Ferrari e Lidiane Cristina Ferraz pela amizade e incentivo nos momentos de dificuldade.

A todos os meus familiares que sempre apoiaram a minha carreira e me incentivaram a vencer os desafios, em especial meu tio Paulo Cesar Talarico pelo incentivo, carinho e ajuda financeira durante meu estágio no exterior.

Aos professores da banca examinadora, que prontamente aceitaram participar desta nova etapa da minha carreira.

A todos os funcionários e enfermeiras do Alojamento conjunto do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pela presteza e apoio durante a coleta e entrevista com as mães participantes ao estudo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo incentivo a minha pesquisa e pelo apoio financeiro (Processos nº. 04/07425-8 e 02/07156-1).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo incentivo financeiro através da concessão da bolsa de Mestrado.

A todas as mães participantes do projeto, sem as quais os resultados obtidos não seriam possíveis.

RESUMO

SESSO, M. L. T. **Análise dos níveis de imunoglobulinas, interleucinas e colonização bacteriana em amostras salivares nos primeiros meses de vida em nascidos a termo e pré-termo.** 2012. 94f. Tese (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O sistema imune de mucosas representa uma importante ferramenta de defesa contra a colonização da cavidade oral, especialmente pela presença das imunoglobulinas salivares no início da vida. Além das imunoglobulinas, as citocinas salivares também possuem funções importantes, pois utilizam células linfóides para amplificar ou deprimir a resposta inflamatória e podem ser consideradas biomarcadores proteicos. No entanto, pouco se sabe sobre a ontogenia dos componentes do sistema imune de mucosas em recém-nascidos a termo (AT) e especialmente em pré-termo (PT, com gestação inferior a 37 semanas) que reconhecidamente apresentam imaturidade imunológica. O objetivo do presente estudo foi o de analisar os níveis de imunoglobulinas (Ig) A (IgA) e M (IgM), citocinas: interleucinas (IL) IL-6, IL-10, IL-12 e interferon (IFN) (IFN- γ) e 20 tipos distintos de bactérias orais em amostras de salivas de crianças ao nascer (T0) e após 3 meses de vida (T3) em PT e AT. Para isto, 123 amostras de saliva (70 AT e 53 PT) foram coletadas e os níveis de IgA e IgM foram quantificados por ensaios ELISA. Em um subgrupo de 50 amostras (25 AT e 25 PT) foram analisadas a presença de 20 tipos diferentes de espécies bacterianas através de *Checkerboard* e os níveis de citocinas através de ensaio Luminex®. Dados socioeconômicos e do nascimento foram avaliados através de questionários. Os resultados do *Checkerboard* mostraram que nenhuma criança apresentou níveis detectáveis das bactérias testadas. Houve diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$) nos níveis de IgA em T0, sendo que PT apresentaram níveis inferiores aos AT, o que não aconteceu em T3. Diferentemente, não houve diferenças nos níveis de IgM entre os grupos e visitas ($p > 0.05$). A análise prospectiva mostrou que houve um aumento dos níveis de IgA de T0 para T3 em ambos os grupos. Quanto à citocinas, houve diferenças somente em T0 entre PT e AT, nos níveis de IL-6 e IL-10 que foram significativamente superiores em PT ($p < 0.05$). Desta maneira, os dados sugerem que a prematuridade pode levar a algumas diferenças no status da resposta imunológica de mucosas no nascimento o que não acontece após 3 meses.

Palavras-chave: Prematuridade, Imunoglobulina A, Imunoglobulina M, citocinas, saliva.

ABSTRACT

SESSO, M. L. T. **Analysis of levels of immunoglobulins, interleukins, and bacterial colonization in saliva samples in the first months of life in infants born fullterm and preterm.** 2012. 94f. Tese (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The mucosal immune system through the secretion of salivary immunoglobulins represent an important line of defense against initial acquisition and bacteria colonization of the oral cavity especially early in life. Cytokines are protein signaling molecules that lymphoid cells use to amplify or down regulate the inflammatory response. Little is known about the ontogeny of the mucosal immune system and bacterial colonization in saliva from neonates at fullterm (FT) and especially preterm (PT, with less than 37 weeks gestation), known to have an immunological immaturity. The aim of this study was to analyze the levels of immunoglobulin A (IgA) and M (IgM), four cytokines: interleukin (IL) IL-6, IL-10, IL-12 and interferon gamma (IFN- γ) and 20 types of bacteria in saliva samples at birth (T0) and after 3 months (T3) in PT and FT. For this, 123 saliva samples (70 FT and 53 PT) were collected and levels of IgA and IgM were quantified by ELISA assays. In a subgroup of 50 samples (25 FT and 25 PT) was analyzed for the presence of 20 different types of bacterial species using checkerboard and the levels of cytokines through Luminex® assay. Economic data and birth partners were assessed through questionnaires. The results the *Checkerboard* showed that no child had detectable levels of bacteria. There were statistically significant ($p < 0.05$) in IgA levels at T0, and PT showed lower levels than FT, which has not happened in T3. In contrast no differences in levels of IgM and visits between the groups ($p > 0.05$). The prospective analysis showed that there was an increase of IgA levels from T0 to T3 in both groups. As for cytokines, there were only differences at T0 between PT and AT, in IL-6 and IL-10 that were significantly higher in PT ($p < 0.05$). Thus, the data suggest that prematurity may lead to differences in the status of the mucosal immune response at birth but not at 3 months of age.

Keywords: Prematurity, Immunoglobulin A, Immunoglobulin M, cytokines, saliva.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Colonização microbiana oral	12
2.1.1	Infecção inicial por colonizadores primários orais	12
2.1.2	Colonização por microrganismos cariogênicos e desenvolvimento de cárie dentária.....	13
2.2	Resposta imune de mucosas contra a invasão microbiana oral no início da vida	13
2.2.1	Imunoglobulinas salivares	14
2.2.2	Citocinas: Interleucinas (IL) e Interferon (IFN)	16
2.3	Desenvolvimento do sistema imunológico e colonização oral em prematuros ...	18
3	OBJETIVOS	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Amostra estudada e delineamento de estudo.....	21
4.2	Questionários	23
4.3	Coleta de saliva	23
4.4	Exames clínicos intra-buciais em T3	24
4.5	Análise dos níveis salivares de imunoglobulinas: IgA e IgM	24
4.6	Análise das concentrações de proteínas das amostras salivares	25
4.7	Análise das concentrações salivares de 20 tipos de microrganismos orais através da hibridização DNA-DNA <i>Checkerboard</i>	26
4.7.1	Cepas bacterianas e condições de crescimento	26
4.7.2	Extração do DNA	27
4.7.3	Quantificação do DNA das sondas	28
4.7.4	Preparação das sondas de DNA marcadas com digoxigenina	29
4.7.5	Hibridização DNA-DNA	29
4.7.6	Deteção das espécies	31
4.8	Ensaio de Luminex® para quantificação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12 e IFN- γ) e anti-inflamatória (IL-10)	33
4.8.1	Preparação das amostras salivares e das microesferas acopladas com as interleucinas	34
4.8.2	Imuno-reações entre as amostras salivares e interleucinas acopladas às esferas	34
4.8.3	Determinação das intensidades de reação entre as amostras e esferas	35

5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
6	RESULTADOS	38
6.1	Análises dos dados maternos e do nascimento coletados nos questionários	38
6.2	Dados do recém-nascido	40
6.3	Dados das crianças após 3 meses (T3 – questionário 2B)	41
6.4	Análises laboratoriais dos níveis de imunoglobulinas, citocinas e microorganismos das amostras salivares	41
6.4.1	Níveis de IgA e IgM nas amostras salivares	41
6.4.2	Níveis de interleucinas: IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- γ nas amostras salivares	44
6.4.3	Correlação entre dados clínicos com os níveis de citocinas	47
6.4.4	Níveis de espécies bacterianas detectadas nas amostras salivares	48
7	DISCUSSÃO	50
8	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS	56
	ANEXOS	64

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é uma importante porta de entrada de uma grande diversidade de microrganismos, sendo que alguns destes, embora passem pelas mucosas, não são capazes de colonizá-las. Outros, entretanto, tornam-se residentes corroborando para a adesão e acúmulo de novas espécies microbianas, ocorrendo assim, um aumento na complexidade das comunidades microbianas (BERKOWITZ; TURNER; GREEN, 1980; SMITH; TAUBMAN, 1992; MARCOTTE; LAVOIE, 1998).

Logo após o nascimento, com um mês de vida, alguns colonizadores iniciais como *Streptococcus mitis* (*S. mitis*) e *Streptococcus oralis* (*S. oralis*), puderam ser detectados em amostras orais de crianças, através de técnicas de repique e crescimento em meios de cultura (SMITH; TAUBMAN, 1990; PEARCE *et al.*, 1995; HOHWY; REINHOLDT; KILIAN, 2001). Após a erupção dentária por volta dos 7 meses de vida, novas espécies passam a colonizar a cavidade oral como, por exemplo, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (CAUFIELD; CUTTER; DASANAYAKE, 1993; SMITH *et al.*, 1998) que é o principal agente etiológico da cárie dentária. No entanto, *S. mutans* foram detectados, antes da erupção dentária, principalmente na população brasileira que é altamente exposta a este microrganismo (ALVES *et al.*, 2009).

Frente a esta desafio infeccioso da cavidade oral, o sistema imune da mucosa representa a primeira linha de defesa, especialmente pela presença da IgA secretora (IgAs) (RUSSELL *et al.*, 1999) na saliva. Esta imunoglobulina é capaz de controlar a microbiota oral através da redução da aderência de bactérias na mucosa oral e na superfície dentária (MARCOTTE; LAVOIE, 1998). Além da resposta imune adaptativa, a defesa inata do indivíduo contra ao desafio infeccioso é representada pelas barreiras epiteliais (pele e superfícies mucosas) e pelos componentes do sistema imune inato, o qual inclui entre outras, moléculas, proteínas e citocinas da resposta inflamatória como interferon alfa (IFN- α), interferon beta (IFN- β), interferon gama (TNF- γ), interleucinas como IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, que contribuem para a ampliação e controle da resposta inflamatória.

Os recém-nascidos são conhecidos por terem uma maior frequência de infecções microbianas do que as crianças mais velhas ou adultas, devido à imaturidade do sistema imunológico (CLAPP, 2006; SADEGHI *et al.*, 2007). Vários fatores podem influenciar o desenvolvimento eficaz de uma resposta imune da mucosa, incluindo o estado nutricional, aleitamento materno, idade gestacional, exposição a antígenos e fatores genéticos (MARUYAMA *et al.*, 2009) o que justifica os bebês nascidos prematuramente terem uma

susceptibilidade 5 vezes maior às infecções bacterianas (KLIEGMAN; ROTTMAN; BEHRMAN, 1990).

A forma não invasiva de coleta de saliva é uma ferramenta muito útil para o estudo da resposta imune de mucosas, pois apresenta níveis satisfatórios de imunoglobulinas, citocinas e peptídeos antimicrobianos (ROHAN *et al.*, 2000; NURKKA *et al.*, 2001). Além disto, o advento de ensaios confiáveis de parâmetros salivares imunológicos vem abrindo portas para inúmeras pesquisas. Medidas salivares de funcionamento do sistema imunológico são de interesse devido ao campo emergente da doença periodontal. Este novo paradigma propõe que a saúde bucal seja uma janela para a saúde sistêmica. No entanto, o volume de saliva, normalmente coletados em crianças, limita a utilização de alguns ensaios laboratoriais. Desta maneira, a busca de metodologias para amostras de pequeno volume como *Checkerboard* e *Luminex* representam um bom caminho para análises variadas.

Um estudo prospectivo com salivas de crianças brasileiras entre 5 a 24 meses de idade, altamente expostas ao *S. mutans*, já mostrou uma alta concentração de IgA, IgM e ainda e um complexo padrão de reatividade de anticorpos IgA salivares contra antígenos de *S. mutans* e *S. mitis* (NOGUEIRA *et al.*, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2007), sugerindo que as respostas positivas à antígenos de virulência destas espécies podem modular a capacidade de colonização do *S. mutans*, visto que crianças não colonizadas apresentavam altos níveis de anticorpos específicos. No entanto, pouco se sabe sobre a ontogenia do sistema imune de mucosas em crianças brasileiras com idades inferiores, especialmente ao nascimento e ao longo dos seus primeiros três meses de vida, daí a importância do presente estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Colonização microbiana oral

2.1.1 Infecção inicial por colonizadores primários orais

Logo após o nascimento, a criança entra em contato com diversos microrganismos presentes no ambiente em que vive, principalmente através da mãe e outras pessoas com quem mantém contato. Alguns dos microrganismos são transitórios, outros se tornam residentes, como por exemplo, os estreptococos que representam a maioria das bactérias que colonizam primeiramente a cavidade bucal.

Com um mês de vida, espécies como *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*), *Streptococcus mitis* biovar 1 (*S. mitis* biovar 1) e *S. oralis*, puderam ser identificados em crianças saudáveis através da utilização de métodos culturais, sendo que, *S. mitis* biovar 1 e *S. oralis*, constituíam a maioria dos estreptococos isolados identificados na boca (PEARCE *et al.*, 1995). *S. mitis* compreenderam a maioria dos estreptococos orais detectáveis em crianças de 1 a 5 meses de idade (SMITH; TAUBMAN, 1990).

Assim que os dentes começam a erupcionar na cavidade bucal, surgem novos sítios de colonização e a microbiota oral torna-se progressivamente mais complexa. A presença de superfícies dentais não descamativas é suficiente para a colonização por vários estreptococos orais, tais como: *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*) (TAPPUNI; CHALLACOMBE, 1993) e *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) (CARLSSON; GRAHNEN; JONSSON, 1975). A colonização inicial de *S. sanguinis* ocorre durante uma discreta “janela de infectividade”, por volta dos 9 meses de idade, estando relacionada significativamente com a erupção do primeiro dente, que ocorre em uma idade mediana de 7,1 meses (CAUFIELD *et al.*, 2000). Posteriormente, um período de 19 a 31 meses de idade é referido como a “janela da infectividade de *S. mutans*” (CAUFIELD; CUTTER; DASANAYAKE, 1993; SMITH *et al.*, 1998).

2.1.2 Colonização por microrganismos cariogênicos e desenvolvimento de cárie dentária

A aquisição inicial de *S. mutans* pode ocorrer antes deste período de janela de infecção (19-31 meses), especialmente em crianças brasileiras que são expostas a um elevado consumo de sacarose e ao contato com a saliva de indivíduos altamente infectados (BERKOWITZ; TURNER; GREEN, 1980; KOHLER; ADREEN, 1994; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001; TANNER *et al.*, 2002; KLEIN *et al.*, 2004). As mães parecem ser as principais fontes de infecção por *S. mutans* (LI; CAUFIELD, 1995). Diversos outros fatores comportamentais, intrínsecos aos hospedeiros e ambientais podem influenciar na infecção inicial de *S. mutans* (TANZER; LIVINGSTON; THOMPSON, 2001), como por exemplo, variações nos hábitos dietéticos, de higiene bucal e deficiências imunológicas. Dentre estes, os fatores que influenciam a maturação do sistema imunológico de mucosas precisam ser mais bem investigados (HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 1999; MICHALEK *et al.*, 2002).

A cárie dental é uma doença infecciosa que representa um problema de saúde pública em muitas populações de diferentes países, incluindo o Brasil. *Streptococcus mutans* são os principais microrganismos envolvidos no desenvolvimento da cárie dental, pois essa espécie possui fatores que modulam sua capacidade de colonizar as superfícies dentárias e se acumular no biofilme dental, produzindo e tolerando ácidos em quantidades suficientes para promover a desmineralização do esmalte dentário, dando início à lesão de cárie (LOESCHE, 1993). O tratamento restaurador das cavidades dentárias formadas, apesar do alto custo e utilização de materiais melhorados, não interfere na colonização por *S. mutans* e a doença continua a se desenvolver, resultando na falha das restaurações realizadas, assim como, no desenvolvimento de novas lesões. Processos mais graves ou negligenciados da cárie dental estão associados ainda com a susceptibilidade do hospedeiro a outras doenças sistêmicas como, por exemplo, a endocardite bacteriana (LI; WANG; CAUFIELD, 2000).

2.2 Resposta imune de mucosas contra a invasão microbiana oral no início da vida

Logo após o nascimento, as crianças são expostas a muitos microrganismos presentes no ambiente e a indivíduos com quem mantêm contato, principalmente as mães, já que a cavidade oral é a porta de entrada destes microrganismos. A presença de resposta imunológica eficaz na cavidade bucal representa uma importante ferramenta contra a invasão, colonização e patogenicidade das inúmeras espécies microbianas. Portanto, a capacidade do

sistema imune responder aos desafios infecciosos durante o estabelecimento da microbiota indígena constitui importante componente de defesa do hospedeiro, já que os níveis bacterianos podem ser controlados pelos anticorpos presentes na saliva. Sendo assim, o entendimento dos componentes imunológicos inatos e adaptativos naturais da cavidade bucal pode fornecer importantes informações a respeito de como a indução de uma resposta imune direcionada pode ser efetiva contra um contato microbiano inicial.

Reconhecidamente, deficiências do sistema imunológico inato e adaptativo podem aumentar a susceptibilidade a agentes infecciosos (GLEESON *et al.*, 1994, SEIDEL *et al.*, 2000, WAN *et al.*, 2003). A saliva desempenha várias funções na manutenção da homeostase da cavidade oral, na proteção dos dentes contra a cárie e também contra a invasão de microrganismos, por possuir um grande número de proteínas com atividade antimicrobiana tais como a lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, aglutininas, mucinas e imunoglobulinas, além de diversos peptídeos como histatina, defensivas e catelicina LL37 (VAN NIEUW AMERONGEN; BOLSCHER; VEERMAN, 2004).

2.2.1 Imunoglobulinas salivares

Dentre as imunoglobulinas encontradas na saliva, as mais frequentemente encontradas e de maior importância são a IgA e IgM. A IgA é a principal imunoglobulina nas secreções e tem função como primeira linha de defesa adaptativa contra patógenos das mucosas (MCGHEE *et al.*, 1992; RUSSELL *et al.*, 1999), como por exemplo, contra enterobactérias e vírus em homens e modelos animais (MICHETTI *et al.*, 1992). Estudos em crianças revelaram que praticamente toda a IgA encontrada na saliva total de crianças está na forma dimérica, estruturalmente idêntica à IgAs, ou seja, associada a um componente secretor (SMITH; KING; TAUBMAN, 1989).

Os níveis totais de IgA têm sido considerados como um indicador do grau de maturidade desse sistema imune, visto que crianças recém-nascidas apresentam níveis inferiores de IgA do que aqueles encontrados em crianças mais velhas e adultos (FITZSIMMONS *et al.*, 1994, GLEESON; CRIPPS; CLANCY, 1995; BRANDTZAEG *et al.*, 1998, SMITH *et al.*, 1998, SEIDEL *et al.*, 2000, WAN *et al.*, 2003). Além disto, reduções transitórias nos níveis de IgA detectados na saliva foram associadas à maior susceptibilidade a infecções do trato gastrointestinal (GLEESON *et al.*, 1994, SEIDEL *et al.*, 2000, WAN *et al.*,

2003) reforçando a importância da maturação do sistema imune de mucosas na susceptibilidade a infecções.

Um estudo com salivas de crianças recém-nascidas com 1 dia ou menos de vida, a concentração média de IgA foi de 19.2µg/ml sendo que após 2 a 10 dias de vida estes níveis aumentaram para 21.6µg/ml (SEIDEL *et al.*, 2000). WAN e colaboradores (2003) mostraram que ao nascimento os valores de concentração de IgA em amostras salivares de bebês variaram entre 0.5 e 12.7µg/ml sendo que estes níveis aumentaram gradativamente do nascimento (média=2.7 ± 4.2µg/ml) aos 18 meses de idade (média=22.4 ± 7.3µg/ml). Entre crianças mais velhas, da faixa etária de 6,5 a 12 anos, a concentração média de IgA foi 201µg/ml. Níveis inferiores, entre 0 a 0.5µg/ml de IgA (média: 22.4 µg/ml ± 7.3) foram detectados na saliva de crianças de 6 a 18 meses de idade, os quais aumentam com a idade (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Em adultos, as concentrações de IgA na saliva variam entre 72µg/ml e 410µg/ml (BRANDTZAEG, 1989; WAN *et al.*, 2003), sendo que a criança atinge níveis semelhantes aos 7 anos de idade (GLEESSON *et al.*, 1990).

A IgM tem o segundo maior nível de imunoglobulina encontrada na saliva, ao nascimento os níveis dessa imunoglobulina foram detectados em somente 15% dos bebês de 1 a 6 meses de idade (GLEESSON *et al.*, 1986, THRANE *et al.*, 1987; SMITH; TAUBMAN, 1992). Smith e colaboradores (1989) demonstraram que os níveis de IgM em amostras salivares de crianças diminuem durante os primeiros 3 a 4 meses de vida, enquanto que os níveis de IgA aumentaram. Deficiências na produção de IgA parecem ser compensadas pela produção e secreção de IgM em crianças de maior idade e adultos (FERNANDES *et al.*, 1995, GLEESON; CRIPPS; CLANCY, 1995). Entretanto, este mecanismo compensatório não foi observado em outro estudo, em crianças durante os primeiros 2 anos de vida (GLEESON; CRIPPS; CLANCY, 1995). Em bebês nascidos prematuramente, a concentração média de IgM em amostras salivares foi de 5.5µg/ml, ligeiramente menor que de bebês nascidos a termo, média= 6.6µg/ml (WAN *et al.*, 2003).

A imunoglobulina G (IgG) também está presente na saliva, mas em pequena quantidade como reflexo da imunidade sistêmica, já que esta imunoglobulina vem do plasma sanguíneo alcançando a cavidade bucal através do líquido crevicular encontrado na interface entre o dente e a gengiva (RUSSELL *et al.*, 1999). Estudo realizado na Austrália por Wan e colaboradores (2003) detectaram IgG na saliva de 61% dos recém-nascidos AT estudados e 56% dos recém-nascidos PT sendo que não houve diferença significativa entre os níveis de IgG.

2.2.2 Citocinas: Interleucinas e Interferons

As citocinas são peptídeos secretados pelas células da resposta imunológica inata e adaptativa e são as mediadoras de muitas funções dessas células (LOPES; CUTRIM, 2001; KUMMAR *et al.*, 2004) podendo ser produzidas durante a fase de ativação e fase efetora da imunidade para mediar e regular a resposta inflamatória e imunitária (GALLIN; SNYDERMAN, 1999). Estes peptídeos são liberados em resposta a microrganismos e outros antígenos agressores, e atuam nas respostas envolvidas na inflamação e na imunidade do indivíduo. As respostas de várias citocinas (IFN- α , IFN- β , TNF- γ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15) desempenham uma importante função na proteção da mucosa bucal (RUSSELL *et al.*, 1999). Mas poucos são os estudos que abordam a presença de interleucinas na saliva, especialmente em crianças. Dentre os estudos existentes estes estão relacionados com indivíduos adultos com doença periodontal (TELES *et al.*, 2009).

Na imunidade inata, as citocinas produzidas por macrófagos e células *Natural Killer* (NK) regulam as reações inflamatórias iniciais a microrganismos, promovendo a eliminação destes. Já na imunidade adaptativa, estimulam a proliferação e a diferenciação de linfócitos estimulados por antígenos e ativam células efetoras especializadas, tais como macrófagos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). As diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias, como interferons (IFN), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β) e fator de transformação de crescimento (TGF). Podem ser pró e anti-inflamatórias, sendo que o desfecho final de um processo inflamatório dependerá do balanço entre elas. As citocinas pró-inflamatórias estimulam a inflamação, diretamente ou pela produção de outras citocinas, estando presentes em níveis elevados no sangue e soro durante a inflamação, sendo elas, a IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF e IFN (MEIROVITZ *et al.*, 2010). As anti-inflamatórias: IL-4, IL-10 e IL-13 atenuam a inflamação pela restrição da produção de citocinas inflamatórias e aumentam a expressão dos receptores solúveis (SARROUH *et al.*, 2007).

O IFN é uma proteína naturalmente produzida no corpo humano, sendo capaz de diferir nos seguintes tipos: IFN- α , IFN- β e IFN- γ . O IFN- γ é liberado após a indução da resposta imune adaptativa, e tem a função de atrair os macrófagos, que auxiliam na remoção de restos celulares e promovem a cicatrização e reorganização das áreas com inflamação (KUBY *et al.*, 1999).

A produção da IL-6 pode ser induzida facilmente por diversos estímulos como infecção viral, antígenos bacterianos, entre outros (VAN DAMME *et al.*, 1987; FONG *et al.*, 1989; UENO *et al.*, 1989). Estudos em monócitos de neonatos mostraram que estímulos microbianos desencadeiam a produção de IL-6 por estas células em níveis similares aos produzidos por indivíduos adultos (MATSUZAKI *et al.*, 1990; SAITO *et al.*, 1990; YACHIE *et al.*, 1990). Estudos recentes mostraram altos níveis de IL-6 no sangue do cordão umbilical em recém-nascidos com sepse neonatal precoce, cujas mães tiveram corioamnionite (YOON *et al.*, 2000; NACCASHA *et al.*, 2001, CHIESA *et al.*, 2003). Sendo assim, a IL-6 é um mediador inflamatório neonatal importante. Além disto, um estudo de Redwine e colaboradores (2000) demonstraram que crianças de 8 a 9 anos, que sofreram algum tipo de estresse, como a privação de sono apresentam aumento dos níveis de IL-6 na saliva se comparadas com aquelas não submetidas a estresse. Perda de sono parece estar associada com a diminuição nos níveis noturnos de IL-6, o que poderia resultar em alterações do sistema imunológico (REDWINE *et al.*, 2000).

A IL-10 é produzida pelos linfócitos B e T “*helper*” tipo 2 (Th2) e pelos monócitos e possui uma função inibitória da proliferação dos linfócitos T “*helper*” tipo 1 (Th1) e da produção de IFN- γ e IL-2, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α . A função dos monócitos como células apresentadoras de antígenos também é inibida pela IL-10 por meio da diminuição da expressão dos antígenos do complexo de histocompatibilidade de classe II, da molécula de adesão intercelular tipo 1 e da expressão do CD23. O aumento nos níveis de IL-10 encontrados no plasma e sangue do cordão umbilical de recém-nascidos PT avaliados para sepse foi associado à mortalidade, sendo considerado como um dos primeiros indicadores de prognóstico de sepse (ROMAGNOLI *et al.*, 2001; CANCELIER *et al.*, 2009).

A IL-12 é a principal mediadora da resposta imune inata aos microrganismos teciduais e indutores chave da imunidade mediada por células. Sua mais importante ação é estimular a produção de IFN- γ pelas células T e NK, promovendo a resposta das células de linfócitos Th1 (GATELY *et al.*, 1998). A importância da IL-12 não está limitada apenas a iniciação da resposta imune mediada por células, mas também para a sua manutenção, uma vez que a ausência desta interleucina está associada a uma rápida eliminação da resposta Th1 (PARK; SCOTT, 2001). Por esse motivo, alguns estudos já analisaram a participação dessas citocinas em processos infecciosos, como as doenças periodontais (YAMAZAKI *et al.*, 1997; GAMONAL *et al.*, 2000; SEYMOUR; GEMMELL, 2001; JOHNSON; SERIO, 2005).

Desta maneira, as citocinas desempenham um papel importante no controle das ameaças antigênicas, especialmente as interleucinas do grupo ativador da resposta de linfócitos Th1: IL-12 e IFN- γ , pois determinam a ativação da resposta de IgAs contra agentes infecciosos distintos nas mucosas (BOYAKA; LILLARD; MCGHEE, 1999; BRADNEY *et al.*, 2002). A produção de interleucinas específicas na cavidade oral parece estar relacionada com desafio microbiano, as bactérias gram-negativas induziram a produção de IL-10, mas não IL-12 e IFN- γ em células mononucleares, algumas bactérias gram-positivas (por exemplo, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus*) estimulou a produção de níveis elevados de IL-12 e IFN- γ , mas não IL-10 (MASON; POWRIE, 1998; JIANG; MAGLI; RUSSO, 1999, HAHN; BEST; TEW, 2000).

2.3 Desenvolvimento do sistema imunológico em prematuros

No Brasil, a frequência de crianças nascidos prematuros, de baixo peso ao nascer (BPN) e com restrição do crescimento intrauterino têm maiores taxas nas regiões mais desenvolvidas do sudeste que em regiões mais carentes como o nordeste (BETTIOL *et al.*, 2000; MONTEIRO; D'AQUINO BENICIO; ORTIZ, 2000; SILVA *et al.*, 2001; ARAGÃO, 2003). Em Ribeirão Preto (SP), nascimento de BPN e PT aumentaram de 7,2% para 10,6% e de 7,6% para 13,6%, respectivamente, em um intervalo de 15 anos, até meados da década de 90 (BETTIOL *et al.*, 2000). BPN e PT são os principais fatores envolvidos na mortalidade infantil. Segundo Kramer em um estudo feito em 2000, mesmo uma pequena redução na duração da gravidez está associada com um aumento na mortalidade infantil. A evolução tecnológica da medicina tem propiciado aumento na sobrevivência de crianças BPN (1500-2499 gramas) e de muito baixo peso ao nascer (MBPN) (500-1499 gramas), mas os custos sociais têm sido muito elevados (HACK *et al.*, 1994; SAIGAL *et al.*, 2000).

A etiologia da prematuridade não é bem conhecida. A potencial associação entre doença periodontal materna e nascimento PT e BPN são amplamente reconhecidas (OFFENBACHER *et al.*, 1996; LOESCHE, 1997; HILL, 1998; DASANAYAKE *et al.*, 2001; MCGAW, 2002). Estudos mostram que infecções neonatais por estreptococos, em especial do grupo B, são adquiridas através da transmissão materno-fetal e podem resultar em doenças de início precoce, que ocorre dentro dos primeiros dias de vida, ou na doença de início tardio, que ocorre após a primeira semana e representa a maioria dos casos de meningite e mortes (JOHRI *et al.*, 2006; JORDAN *et al.*, 2008; PULVER *et al.*, 2009).

Estudos para a caracterização do sistema imune de mucosas em prematuros são ainda escassos, especialmente com relação à resposta imune específica aos microrganismos orais. No início dessa década, SEIDEL e colaboradores (2000) mostraram que a presença e os níveis medianos de IgA foram semelhantes entre crianças PT (mediana=2,3 µg/ml) e AT (mediana=1.9µg/ml). No entanto, WAN e colaboradores (2003), avaliaram salivas de bebês do nascimento aos 18 meses de idade e encontraram algumas diferenças entre PT e AT, já que a ausência de IgA foi mais frequente entre crianças prematuras (69%) do que em a termo (56%), o que não aconteceu com os níveis de IgG e IgM. Portanto, existem algumas controvérsias a respeito da ontogenia da IgA em recém nascidos, especialmente em bebês prematuros (HAYES *et al.*, 1999).

Há pouca informação ainda sobre a colonização bucal em prematuros. Os estudos envolvendo este grupo de nascidos prematuramente ocorrem em crianças mais velhas, que apresentam defeitos na formação do esmalte dental, resultantes de distúrbios de mineralização (SEOW, 1996; LAI *et al.*, 1997; SEOW, 1997; AINE *et al.*, 2000; LAW & SEOW, 2006). Tais defeitos no esmalte parecem contribuir para uma predisposição 26 vezes maior para a colonização de *S. mutans* (WAN *et al.*, 2003) sendo que aos 24 meses de idade, 94 e 79% de crianças prematuras e não prematuras respectivamente eram colonizadas por este microrganismo (WAN *et al.*, 2003).

Desta maneira, há necessidade de uma maior entendimento da colonização microbiana, níveis de imunoglobulinas e citocinas em amostras salivares de crianças nascidas pré-termo e a termo, do nascimento até os 3 meses de vida é a fim de avaliar essa evolução da resposta imune e as possíveis diferenças em relação a idade gestacional.

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi descrever a quantidade e desenvolvimento de alguns componentes do sistema imune de mucosas durante o desafio antigênico bacteriano inicial, em crianças nascidas AT e PT em um estudo prospectivo envolvendo duas visitas: ao nascimento, com aproximadamente 10 horas de vida (T0) e aos 3 meses de idade (T3) através de amostras salivares para análise imunológica e aplicação de questionários contendo informações socioeconômicas, de saúde geral materna e do recém-nascido ao nascimento (T0 - ANEXO 2A) e aos 3 primeiros meses de vida (T3 - ANEXO 2B). Além da análise dos prontuários clínicos do HC/FMRP.

Para isso, objetivos específicos do estudo incluíram:

- a) Determinar as concentrações salivares de anticorpos IgA e IgM encontrados na saliva ao nascimento e aos 3 meses de vida;
- b) Rastrear e detectar a possível presença de DNA de 20 espécies bacterianas orais nas amostras salivares;
- c) Quantificar os níveis salivares das citocinas: IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- γ ;
- d) Associar os dados coletados nos questionários e prontuários com os imuno-ensaios

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra estudada e delineamento de estudo

Este estudo envolveu a participação de 123 crianças nascidas na Maternidade do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto- SP, de março a dezembro de 2010. Dessas crianças, 70 eram nascidas a termo e 53 nascidas pré-termo, sendo 59 meninos e 64 meninas. Todas as mães autorizaram a participação da criança e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1). Aos participantes da pesquisa foi garantido o direito de interrupção da participação no estudo em qualquer momento, acesso aos resultados dos exames clínicos e complementares, sigilo absoluto sobre os mesmos.

As crianças elegíveis ao estudo deveriam estar no alojamento conjunto e apresentando boa saúde geral. Com base nos dados coletados nas entrevistas, não foram selecionadas crianças que apresentavam:

- (1) idade superior a 10 horas de vida em T0 e a 3 meses em T3;
- (2) malformações congênitas;
- (3) instabilidade cardiorrespiratória;
- (4) tratamentos prévios com corticóides ou antibióticos;
- (5) sinais clínicos de infecção identificados;
- (6) tenham sido amamentadas há menos de 3 horas.

Estes critérios de não inclusão foram importantes para não submeter os bebês ao mínimo estresse e ainda evitar possíveis alterações dos níveis de anticorpos e de concentração de microrganismos na cavidade bucal (NISENGARD; NEWMAN, 1994).

A aplicação do questionário e as coletas das amostras salivares, ao nascimento (T0) foram realizadas no alojamento conjunto pelas pós-graduandas Maria Lúcia Talarico Sesso (mestranda) e Mariana Loureiro Castro e Borges (doutoranda). Após 3 meses da coleta inicial (T3), todas as mães participantes foram convidadas para avaliação e nova coleta de amostra a fim de verificar a evolução do desenvolvimento do sistema imune de mucosa e possível colonização microbiana oral. Esta coleta e a avaliação da cavidade bucal foram feitas na Sala Clínica da FAEPA pela pós-doutoranda Ruchele Dias Nogueira (Cirurgiã-Dentista). Outras informações sobre a gestação e saúde geral dos recém-nascidos foram obtidas através

da análise dos prontuários clínicos observados pelos médicos do Hospital das Clínicas - HCRP no momento do parto e pós-parto.

Técnicas de higiene oral dos bebês e das mães foram oferecidas por meio de palestras de prevenção de cárie para as mães. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP (ANEXO 3). A Tabela 1 ilustra o delineamento do estudo e os procedimentos realizados em cada etapa do estudo durante as visitas.

Tabela 1 - Delineamento do estudo prospectivo iniciado com uma amostra de 123 crianças na faixa etária de 0 dia de vida, as quais nasceram na Maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP). Estas crianças foram acompanhadas durante 3 meses. No início do estudo (T0) e após 3 meses (T3), as crianças tiveram a cavidade oral examinadas e tratadas se necessário. Aos exames, amostras salivares foram coletadas, para a análise da colonização microbiana e para estudo dos níveis/padrões de produção de anticorpos IgA, IgM e citocinas. As mães foram entrevistadas durante as duas visitas.

<i>Procedimentos</i>	T0	T3
Exame Clínico	SIM	SIM
Entrevista com as mães	SIM	SIM
Questionário 1	SIM	NÃO
Questionário 2	NÃO	SIM
Coleta e estocagem de amostras	SIM	SIM
Seleção das amostras salivares para os ensaios laboratoriais	SIM	SIM
Orientação sobre amamentação, prevenção de cárie e higiene oral	SIM	SIM
Tratamento clínico	NÃO	SIM

Em T3, um total de 55 crianças retornaram para análise, sendo 30 nascidas a termo e 25 pré-termo. Desta maneira, as análises comparativas da evolução da resposta imune de mucosas, através da quantificação dos níveis de imunoglobulinas e interleucinas, e da detecção de microrganismos foram realizados em 25 pares de crianças AT e PT em T0 e as mesmas analisadas em T3, totalizando 50 amostras em cada visita. Os resultados parciais do presente estudo foram publicados no artigo intitulado **Salivary IgA antibody responses to *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* in preterm and fullterm newborn children**. *Arch Oral Biol.* 2012 (6):647-53 (ANEXO 4) e um novo artigo, que está em fase de preparação para publicação intitulado *Salivary levels of cytokines in preterm and fullterm neonates* (ANEXO 5).

4.2 Questionários e avaliação dos prontuários clínicos

No início do estudo, as mães das crianças envolvidas foram entrevistadas em T0, com base em um questionário (número 1- ANEXO 2A), o qual compreende questões maternas como perfil racial, socioeconômicos, tipo de parto, idade gestacional, intercorrências durante a gravidez, uso de medicamentos, pré-natal, hábitos de higiene bucal e ainda, dados dos recém-nascidos, como peso e comprimento ao nascer, perfil racial, sexo e amamentação.

Em T3, um novo questionário (número 2 - ANEXO 2B) foi aplicado às mães que compareceram em que dados de saúde da criança foram analisados. Dados como a dieta (aleitamento materno, dieta complementada ou restrita com leite artificial), problemas de saúde, uso de medicamentos e chupetas foram avaliadas.

Também foram avaliados os prontuários clínicos, com autorização da Profa. Virginia Paes Leme Ferriani, onde foram avaliados, tempo de bolsa rota e expulsão, infecções e doenças antes e durante o período gestacional, o uso de medicamentos durante a gestação e infecções neonatais, na tentativa de se verificar alguma situação de estresse ou infecção as quais os bebês foram submetidos durante a gestação ou após o nascimento.

4.3 Coleta de saliva

Amostras de saliva total não estimulada foram coletadas com uma pipeta Pasteur graduada de polipropileno estéril. As amostras foram transferidas para tubos de 1,5ml e colocadas imediatamente em gelo, sendo 10µl de solução 250mM de EDTA adicionados, obtendo-se uma concentração aproximada de 5mM, para inibir a ação de IgA1 proteases e prevenir a formação de complexos Ig-mucinas (FITZSIMMONS *et al.*, 1994).

A saliva foi clarificada através de centrifugação a 13.000 rpm em microcentrífuga (Eppendorf, EUA) refrigerada (4°C) por 5 minutos e, a seguir, congelada a -70°C. As amostras salivares foram coletadas pelo menos 3 horas após a primeira mamada da manhã para evitar coleta de componentes não salivares.

4.4 Exames clínicos intra-bucais em T3

Após a coleta das amostras salivares, os rodetes gengivais foram higienizados com gaze e água filtrada para a realização dos exames clínicos intra-bucais. A partir da inspeção visual e apalpação os dados coletados foram registrados em fichas clínicas e presença de eventuais lesões de tecidos moles ou ósseas. Todos os exames bucais foram realizados por um único examinador (Ruchele Dias Nogueira [R.D.N.]), previamente treinado e calibrado.

4.5 Análise dos níveis salivares de imunoglobulinas: IgA e IgM - ELISA

Placas de 96 poços (Costar, EUA) foram sensibilizadas com uma solução de anticorpo IgG de cabra anti-IgA humana purificado (Zymed, EUA) na concentração de 2µg/ml, diluído em tampão I (carbonato-bicarbonato pH 9.6), durante incubação por 2,5 horas a 37°C, seguida de incubação a 4°C durante 14 a 16 horas. A seguir, as placas foram lavadas em Lavador de ELISA (Thermoplate, BR) durante 3 minutos, por 3 vezes, com tampão II (contendo 0,9% cloreto de sódio, 0,05% Tween 20 e 0,02% ázida sódica). Os poços foram então bloqueados com 100µl de tampão III (fosfato de sódio, 1% albumina bovina, pH 7.5), durante 1 hora, sob agitação, em temperatura ambiente.

Após nova série de lavagens com tampão II, 100µl das amostras salivares diluídas 1:200 em tampão III foram adicionadas por poço em triplicata e as placas foram então incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente e sob agitação. Diluições seriadas de IgA humana purificada (Calbiochem, EUA) nas concentrações de 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0312µg/ml, e de duas amostras de saliva controle de adultos e uma de criança foram aplicadas em duplicata às placas, para determinação de uma curva de concentração de IgA humana e controle de reprodutibilidade dos ensaios.

Após incubação com as salivas e padrão de IgA purificada, as placas foram lavadas por 3 vezes durante 3 minutos com tampão II. Adicionaram-se 100µl/poço de solução 1:500 de anticorpos IgG de camundongo anti-IgA humana (Sigma, EUA) e as placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente, sob agitação e, a seguir, lavadas e posteriormente incubadas com 100µl/poço de solução 1:10.000 de anticorpos IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com biotina (Sigma). As placas foram então incubadas por 2 horas em temperatura ambiente, sob agitação e, a seguir, lavadas como descrito

anteriormente. Posteriormente solução de estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina (Sigma) diluída a 1:500 em tampão III foi aplicado nos poços e incubados por 18 horas em temperatura ambiente.

Após nova série de lavagens, as reações de ELISA foram reveladas pela incubação com substrato p-nitrofenilfosfato (Zymed), foi diluído em tampão IV (contendo 0.2M carbonato de sódio, 0.2M Bicarbonato de sódio e 0,02% cloreto de magnésio, pH 9.8). Esta reação, com o substrato, foi desenvolvida por 20, 40 e 60 minutos em temperatura ambiente e as absorbâncias (A_{415nm}) medidas em leitor de ELISA (BioRad-EUA). Os níveis de IgM na saliva foram determinados em todas as amostras coletadas, seguindo-se o mesmo protocolo acima para IgA. No entanto, utilizaram-se anticorpos monoclonais de camundongo IgG1 anti-IgM humana (Zymed), nas diluições 1:500. Curvas padrão foram obtidas, utilizando-se amostras de IgM humana purificada (Calbiochem) nas concentrações de 2,0; 1,0; 0,5; 0,25, 0,125, 0,0625, 0,031 $\mu\text{g/ml}$. Como controles negativos, foram utilizados poços das mesmas placas não sensibilizados e poços sensibilizados, mas não incubados com saliva. Os valores médios de absorbância dos controles negativos foram descontados dos valores da absorbância das amostras testadas. Uma curva de concentração de IgA e IgM por unidade de ELISA foi determinada a partir das reações das amostras de IgA e IgM purificada. Estas curvas foram utilizadas para determinação das concentrações de IgA e IgM nas amostras de saliva.

4.6 Análise das concentrações de proteínas das amostras salivares

Para controle da interferência de variações do fluxo salivar nos níveis totais de IgA, as quantidades de IgA salivar determinadas nos ensaios de ELISA foram normalizados pelas concentrações de proteína das amostras de saliva testadas. Para isto, as concentrações de proteínas salivares foram determinadas através do método de Bradford, utilizando-se os reagentes do kit de Bradford (Biorad). Resumidamente, 1ml de saliva clarificada diluída (1:161) em água destilada foi misturada a 1ml de reagente de Bradford em cubetas plástica descartável. Após incubação a temperatura ambiente durante 5 minutos, as absorbâncias das amostras (A_{595nm}) foram medidas em espectrofotômetro digital (Thermo Scientific, EUA). Uma curva padrão, de concentração de proteínas, foi obtida a partir da medida das A_{595nm} de 5 diluições seriadas de BSA (Sigma) em concentrações entre 10 a 1,25mg/ml. A linearidade das reações foi determinada a partir da equação de regressão linear da curva de BSA

($r=0,9996$, $y=0,0375x+0,0194$), a qual foi utilizada para determinação das concentrações de proteínas das amostras salivares. Como controle negativo utilizou-se volumes de água destilada iguais aos das amostras de saliva diluídas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7 Análises das concentrações salivares de 20 tipos de microrganismos orais através da hibridização DNA-DNA *Checkerboard*

A técnica de Hibridização DNA-DNA *Checkerboard* é método rápido e eficaz de análise de um grande número de bactérias em uma única vez, em amostras de biofilme dentário. Esta técnica foi trazida do The Forsyth Institute, Boston, EUA, e empregada em Laboratório de Pediatria da FMRP/USP para tentar avaliar vários microrganismos orais, pioneiramente nas amostras salivares do presente estudo, que eram de pequeno volume.

4.7.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento

Os ensaios para determinação dos diferentes tipos bacterianos com auxílio da tecnologia de hibridização DNA-DNA *Checkerboard* foram realizados com sondas de 20 tipos diferentes de DNA bacteriano, listados na Tabela 2 abaixo. Essas cepas foram selecionadas, primeiramente por se tratar de colonizadores da cavidade oral e estarem envolvidas em doenças como a cárie dental. Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (*American Type Culture Collection*, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, EUA) e cultivado em ágar triptose de soja contendo 5% de sangue de ovelha desfibrinado (BBL, Baltimore Biological Laboratories, EUA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). *Porphyromonas gingivalis* foi cultivada em meios de cultura enriquecido de forma a suprir suas necessidades nutricionais, contendo ágar triptose de soja com 5% de sangue de ovelha desfibrinado, 0,3µg/ml de menadiona (Sigma), 5µg/ml de hemina (Sigma).

Tabela 2 - Relação das cepas empregadas para a confecção das sondas de DNA.

Microrganismos	Cepas (ATCC)
<i>Streptococcus mutans</i>	31341
<i>Streptococcus sobrinus</i>	33478
<i>Streptococcus anginosus</i>	33397
<i>Streptococcus constellatus</i>	27823
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558
<i>Streptococcus mitis</i>	49456
<i>Streptococcus oralis</i>	33037
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12927
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10015
<i>Streptococcus sanguinis</i>	29667
<i>Moraxella catarrhalis</i>	25240D
<i>Haemophilus influenzae</i>	33296
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	29523
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	25586
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	33591
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277
<i>Prevotella intermedia</i>	25611

4.7.2 Extração do DNA

As cepas bacterianas foram anaerobicamente cultivadas na superfície de ágar-sangue contido em placas de Petri (Costar). As colônias foram raspadas e depositadas em tubos de microcentrífuga de 1,5ml contendo 1ml de solução TE (contendo 10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7.6) que foram agitados em vortex (VWR International, EUA) para dispersão dos grumos de colônias. Os tubos contendo as amostras foram sonicados por 10 segundos e as células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3500 rpm por 10 minutos para remoção do sobrenadante. Em seguida, as células das cepas gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com solução contendo 10% dodecilsulfato de sódio (Sigma) e 20mg/ml proteinase K (Sigma).

As cepas gram-positivas foram lisadas em 150µl de uma mistura enzimática contendo 15mg/ml de lisozima (Sigma) e 5mg/ml de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão de TE (pH 8.0). Os tubos foram então, imersos em banho-maria por 1 hora a 37°C. Após o período de incubação, foram adicionados 567µl de TE e 30µl de SDS a 10%. O próximo passo foi adicionar 3µl de proteinase K (Sigma) agitar em vortex e incubar em banho-maria, overnight para gram-positivas e por 1 hora para gram-negativas. Foi aplicado

150µl de NaCl a 5M para ajustar a concentração salina, esse momento é crítico pois, foi no próximo passo que o DNA se expôs. Em seguida, foram adicionados 85µl de brometo de cetiltrimetilamônio contendo cloreto de sódio e após agitação em vortex, foi incubado a 65°C por 20 minutos. Após o período de incubação e lavagem foi adicionado 700µl de solução de clorofórmio: isoamil: álcool (Sigma) manualmente agitado por inversão do tubo e centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos, obtendo um *pellet* que foi descartado. Ao sobrenadante remanescente foram adicionados 700µl de fenol: isoamil: álcool (Sigma), centrifugado novamente e o *pellet* desprezado, posteriormente foram adicionados 600µl de isopropanol (Sigma) obtendo-se a precipitação do DNA, e após uma nova centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos, foi desprezado o sobrenadante.

Ao *pellet* foram aplicados uma solução de 300µl de tampão TE contendo 2µl de RNase (Roche-EUA) e incubado a 50°C por 1 hora. Para garantir a total remoção de todas as proteínas, foram adicionados em seguida, 30µl de acetato de sódio a 3M e 400µl de clorofórmio: isoamil: álcool (Sigma). Para precipitação do DNA nos tubos foi adicionado 660µl de etanol a 95% seguido de centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos e remoção do sobrenadante. Então, o *pellet* obtido foi lavado por 2 vezes com 500µl de etanol 70% seguido de centrifugação. O sobrenadante obtido foi removido e o *pellet* de DNA secado por 30 minutos. Ao secar o DNA, este foi dissolvido com tampão TE e deixado em incubação *overnight* a 37°C.

4.7.3 Quantificação do DNA das sondas

Para normalização das sondas confeccionadas para serem aplicadas a técnica do *Checkerboard* houve necessidade de se quantificar o DNA de cada tubo. Uma alíquota de DNA diluído em tampão TE foi adicionado em cubetas quartzo para leitura no equipamento de espectrofotometria Nanodrop® (Thermo Scientific). Após a leitura, as amostras foram normalizadas para uma concentração de 200ng/µl.

4.7.4 Preparação das sondas de DNA marcadas com digoxigenina

Em um volume de 15µl de todos os DNA normalizados foram adicionados 2µl de hexanucleotídeo (Roche) e posteriormente agitado em vortex e fervido por 10 minutos. Após fervura, as amostras foram imersas em gelo e receberam 2µl de digoxigenina (Roche), seguida de 1µl da enzima Klenow (Roche) e incubação a 37°C *overnight*. No dia seguinte, foram adicionados 2µl de EDTA a 0,2M e 1ml de TE e estocadas para uso posterior. Como controle padrão foram feitos “*standard*” com um mix de todas as bactérias, numa concentração de 10^5 (1ng/µl) e 10^6 (10ng/µl) células. Para isto, foram misturadas todas as sondas, sendo que cada uma delas tem uma concentração de 100.00ng/µl e 1.000.000ng/µl para obtenção de 10^5 e 10^6 células.

4.7.5 Hibridização DNA-DNA

A técnica de hibridização DNA–DNA *Checkerboard* foi realizada como descrito previamente por Socransky e colaboradores (1994). Nas amostras salivares diluídas (1:200) foram adicionados 100µl de solução de hidróxido de sódio a 0,5M e as suspensões fervidas em banho-maria por 10 minutos. Após fervura, as suspensões foram neutralizadas com a adição de 800µl de acetato de amônia (Sigma) a 5M, o que permitiu a lise e a suspensão do DNA na solução. Cada suspensão de amostra salivar contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* (Immuntetics, EUA) representado na Figura 2 abaixo ficando, assim, concentrada em uma membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham, UK). As duas últimas canaletas do *Minislot* (Immuntetics) foram ocupadas pelos “*standard*” controle contendo uma mistura do DNA das espécies de microrganismos investigadas pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células (SOCRANSKY *et al.*, 1994).

A membrana foi então removida do *Minislot* (Immuntetics) e o DNA fixado por meio de aquecimento em forno a 120° C por 20 minutos.

Figura 1AB - Imagens do *Minislot* e aplicação das amostras e *standard* padrão (A) e da remoção da membrana de nylon carregada com o DNA das amostras do aparato (B).

Posteriormente, a membrana foi pré-hibridizada a 42°C por 1 hora numa solução contendo 50% de formamida, 5X SSC (150 mM de cloreto de sódio, 15mM de citrato de sódio (pH 7.0), 1% de caseína, 25mM de fosfato de sódio (pH 6.5) e 0,5mg/ml de RNA de levedura (Sigma). Em seguida a membrana foi colocada sob a peça acrílica do *Miniblotter* 45® (Immunetics) ilustrada na (Figura 2A) abaixo com as linhas, contendo DNA fixado, numa posição perpendicular às canaletas (ângulo de 90°) do aparato (Figura 2B).

Figura 2AB - Imagem do *Miniblotter* (A). Aplicação das sondas perpendicularmente as amostras (B).

Cada canaleta do *Miniblotter* (Immunetics) foi preenchida com 143µl de uma determinada sonda de DNA bacteriano (20ng/ml de DNA) contida em uma solução de hibridização (45% de formamida, 5X SSC, 1% de caseína, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6.5) e 0,2mg/ml de RNA de levedura, 10% sulfato dextrano, 1% de caseína. Desta maneira, DNA genômico de 20 cepas de bactérias marcadas com digoxigenina foram hibridizadas em linhas individuais do *Miniblotter* (Immunetics). Os diferentes tipos de sondas de DNA foram preparados como descrito em Ximenez-Fyvie *et al.* (2000). O aparato contendo a membrana foi embalado com material PVC e inserido em uma embalagem plástica contendo 50ml de água destilada para evitar a desidratação. A hibridização das amostras fixadas na membrana com as sondas marcadas foi efetuada a 42°C por um período mínimo de 16 horas.

4.7.6 Detecção das espécies

Após hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do *Miniblotter* (Immunetics) e lavadas com solução contendo 20mM de tampão fosfato, 1mM de EDTA e 1% de dodecilsulfato de sódio (Sigma), por 5 minutos a temperatura ambiente, seguido por duas lavagens posteriores de 20 minutos cada a uma temperatura de 68°C a fim de se remover as sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora em solução contendo ácido maléico (Sigma) a 0,1M, cloreto de sódio (Synth, BR) a 3M, hidróxido de sódio (Synth) 0,2M, Tween 20 a 0,3%, caseína (Sigma) a 0,5% (pH 8.0), e 30 minutos na solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado com a fosfatase alcalina (Sigma).

As membranas foram então novamente lavadas com uma solução contendo ácido maléico (Sigma) a 0,1M, cloreto de sódio a 3M, hidróxido de sódio 0,2M, Tween 20 a 0,3%, caseína a 0,5% (pH 8.0) por 4 vezes por 10 minutos e uma vez por 5 minutos em Tris-HCl (Biorad) 50mM e cloreto de sódio 50mM (pH 9.5). Em seguida, as membranas foram incubadas numa solução contendo substrato da enzima, CDP-Star® (Amersham), por 45 minutos a 37°C. Ao final, as membranas foram colocadas em um cassete de autorradiografia, sob um filme radiográfico (Amersham) por aproximadamente 40 minutos e revelados em seguida na máquina de revelação (Kodak, RP X-Omat processor, EUA) para detecção dos sinais de quimioluminescência. Ao final, obtém-se um filme radiográfico com os sinais detectados pelas sondas de DNA (Figura 3). As linhas horizontais representam as amostras

salivares e as linhas verticais, as sondas de DNA, formando uma espécie de tabuleiro de xadrez.

Após a revelação dos filmes sensibilizados, imagens digitais de alta resolução dos mesmos foram capturadas em scanner de densitometria (BioRad), as quais foram aplicadas nas análises comparativa dos sinais emitidos pelas amostras, com as amostras controle, feitas a partir do DNA de todas as bactérias que estão sendo pesquisadas e colocadas nas duas últimas canaletas do *Minislot*, que equivalem a 10^5 e 10^6 células. Desta forma, obtivemos um número aproximado de células bacterianas de cada amostra.

Figura 3 - Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas sondas de DNA (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*). Nesta figura estão apresentadas 20 bactérias e a amostra salivar de uma criança de 5 meses de idade.

4.8 Ensaio de Luminex® para quantificação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12 e IFN- γ) e anti-inflamatória (IL-10)

Os ensaios para determinação da reatividade das amostras salivares a diferentes interleucinas foram realizados com auxílio da tecnologia de citometria de fluxo de microesferas fluorescentes Luminex¹⁰⁰ (Luminex Corp.) do Departamento de Imunologia do The Forsyth Institute de Boston, Massachusetts, EUA. A escolha desta tecnologia surgiu da necessidade de se avaliar a presença de várias interleucinas (quatro tipos distintos) a partir de volumes muito pequenos das amostras salivares, já que estas mesmas amostras foram utilizadas para a quantificação de imunoglobulinas e microrganismos. Este sistema consistiu da análise de citometria de fluxo de microesferas fluorescentes, capaz de discriminar mais de 100 antígenos diferentes ligados a estas microesferas de poliestireno, discriminadas por cores específicas, como suporte sólido para um imuno-ensaio convencional (como, por exemplo, ELISA).

Para a determinação dos níveis de interleucinas: IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- γ foram utilizados o kit *High Sensitivity human Citokine* (Millipore Corporation, EUA). A técnica foi realizada de acordo com as especificações do fabricante, descrita a seguir. As microesferas de cada tipo sensibilizadas com cada interleucina foram misturadas em um único poço, contendo um pequeno volume de amostra biológica. Este sistema de esferas que se desenvolve em uma placa de 96 poços, ao equipamento Luminex¹⁰⁰ (Luminex Corp.) como mostrado na Figura 5, que possui um programa de computador dotado de um hardware denominado Flowmetrix e um software desenvolvido pela Luminex Corporation, Austin, Texas, EUA. Desta maneira, o Luminex¹⁰⁰ (Luminex Corp.) é programado e controlado por este sistema operacional computadorizado, baseado em uma citometria de fluxo, fornecendo, em tempo real, a classificação da microesfera pela cor e a análise da reação desta com a amostra, simultaneamente. Assim foram analisadas as imuno-reações com todas interleucinas a partir de uma única amostra de saliva.

Figura 4 - Equipamento Luminex¹⁰⁰ (Luminex Corp.). Utilizado para análise da presença de interleucinas em imuno-reações com amostras de saliva.

4.8.1 Preparação das amostras salivares e das microesferas acopladas com as interleucinas

Cinquenta microlitros de amostras salivares foram diluídas a 1:10 em tampão *Licoplexassay buffer* e filtradas em filtros Spin X (Corning Incorporated, EUA) de poros de 0,45mm de diâmetro. Iguais concentrações de cada tipo de microesfera previamente sensibilizadas com cada interleucina ou não sensibilizadas (controle negativo) foram misturadas em um único tubo e acrescidas de tampão PBS-BN (Sigma) e estocado na ausência de luz.

4.8.2 Imuno-reações entre as amostras salivares e interleucinas acopladas às esferas

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços de fundo contendo membranas filtrantes de poros de 1.2µm de diâmetro (Millipore, EUA). As placas foram previamente lavadas, por duas vezes, com tampão de lavagem fornecido kit, com auxílio de sistema de filtração a vácuo (Millipore). Após vigorosa sonicação das microesferas misturadas foi aplicado 2µl desta mistura em cada poço da placa e posteriormente as amostras salivares diluídas e filtradas foram aplicadas. A partir de então as placas foram incubadas overnight sob agitação constante (550 rpm) em ausência de luz, a 4°C.

Decorridos o tempo de incubação com as salivas, as placas foram submetidas novamente a vácuo, para remoção da solução remanescente e as esferas lavadas por 2 vezes com tampão de lavagem, utilizando-se o mesmo sistema de filtração. Após as lavagens, adicionou-se, 50µl de solução de anticorpo de detecção do kit por poço que foram então incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, em escuro sob agitação. Após isto, as esferas foram novamente lavadas por duas vezes e incubadas com 50µl em cada poço com a solução de detecção do kit *Streptavidin-Phycoerythrin* (Millipore) por 30 minutos, a temperatura ambiente em escuro, as esferas foram lavadas duas vezes sob filtração e resuspendidas com 100ml de *Sheath Fluid* (tampão de transporte do sistema Luminex). Após agitação vigorosa (por 90 segundos a 1000 rpm), para dispersão das microesferas, as placas foram inseridas no equipamento Luminex¹⁰⁰ (Luminex¹⁰⁰ flowanalyser).

4.8.3 Determinação das intensidades de reação entre as amostras e esferas

As mensurações das intensidades das imuno-reações com anticorpos conjugados com *Streptavidin-Phycoerythrin* (Millipore) foram determinadas para cada tipo de esfera, com auxílio do sistema Luminex¹⁰⁰. Através deste sistema, foram medidas as intensidades 100 microesferas de cada um dos tipos utilizados, as quais foram separadas segundo seus diferentes comprimentos de onda de fluorescência interna. A partir disto, valores arbitrários de fluorescência, foram fornecidos para cada interleucina, os quais correspondiam ao valor mediano entre as reações obtidas de 100 microesferas de mesmo tipo. Para isto, as suspensões de esferas presentes em cada poço, foram aspiradas das placas e transportadas para um compartimento interno do equipamento Luminex¹⁰⁰, o qual emite dois tipos de laser, como ilustrado na Figura 5. Um, dos dois tipos diferentes de laser, detecta a intensidade de luz emitida pelo *Streptavidin-Phycoerythrin* (Millipore), enquanto que o outro tipo de laser detecta a fluorescência interna da esfera (discriminatório do tipo de esfera).

Figura 5 - Imagem representativa dos dois tipos de laser emitida pelo Luminex¹⁰⁰ para discriminação das microesferas e determinação das intensidades de emissão de luz pela reação entre amostra salivar específico as interleucinas.

Desta maneira, o primeiro laser excita às moléculas fluorescentes (PE), ligadas a superfície da microesfera e o segundo laser excita os fluorocromos encaixados internamente nas microesferas e que as classificam em diferentes tipos, os quais são importantes para a separação através de filtros seletivos. Os sinais de fluorescência de *Streptavidin-Phycoerythrin*= R-ficoeritrina (PE) são então discriminados para cada tipo de microesfera utilizada e convertidos em Unidades de Fluorescência Relativa (UFR) por um processador de sinais digitais.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variações dos níveis de IgA, IgM e interleucinas foram analisadas através da análise de correlação de Pearson e teste de variância não paramétrico.

Para análise dos microrganismos detectáveis nas amostras salivares de bebês através da hibridização DNA-DNA *Checkerboard* foi utilizado o teste ANOVA. Diferenças nos níveis médios, nas proporções de microrganismos e na média de frequência de detecção em cada grupo foram avaliadas por meio de Análise de Covariância. Todas as análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas, como proposto por Socransky *et al.* (1991). Foi aplicada a fórmula $0,05=1 - (1-k)^{38}$, onde k é o valor equivalente ao $p<0,05$ quando ajustado para a comparação de 20 bactérias. Diferenças nos valores médios de Unidades de Fluorescência Relativa (UFR) resultantes das imuno-reações entre saliva e interleucinas, entre os grupos de crianças PT e AT foram avaliadas através do teste de Mann-Whitney.

6 RESULTADOS

6.1 Análises dos dados maternos e do nascimento coletados nos questionários

Os dados coletados através do questionário 1 estão representados na Tabela 3 abaixo. O perfil racial mais frequente foi o da raça branca, seguido pela afro-descendente não havendo associação entre cor e prematuridade (Correlação de Pearson, $r=0,09$, $p=0,37$) já que alguns estudos mostram que mães negras têm mais chances de parto prematuro. Quanto à escolaridade, a maioria das mães apresentou escolaridade abaixo do 2º grau, sendo que apenas 6 tinham grau superior incompleto. A renda mensal familiar variou entre R\$ 200,00 a 3.000,00 (média=R\$ 935,00 $\pm$ 531,00) não havendo diferenças entre mães de prematuros ou não ($p>0,05$). Dentre as profissões mais comuns estavam a do lar ($n=32$) seguido pelas estudantes ($n=7$).

Noventa e nove por cento das mães realizaram acompanhamento pré-natal, sendo que apenas uma não realizou. Quarenta e seis por cento das mães selecionadas apresentaram complicações durante a gestação. Dentre as mães de prematuros, 58% ($n=30$) delas, apresentaram complicações durante o pré-natal, sendo as mais frequentemente relatadas foram a hipertensão, infecções urinárias e diabetes.

O uso de medicamentos durante a gestação foi informado por 92% ($n=65$) e 71% ($n=37$) das mães de recém-nascidos a termo e prematuros, respectivamente. Das informações obtidas através do prontuário médico de cada paciente, constatou-se que, os principais medicamentos utilizados foram sulfato ferroso, antibióticos, corticóides e anti-hipertensivos durante a gestação. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p>0,05$).

O questionário 1 também permitiu a análise dos dados sobre as condições de higiene oral das mães. Cinquenta e oito e 48% das mães de AT e PT respectivamente responderam que visitaram regularmente o dentista nos últimos 9 meses. Das mães que não frequentaram regularmente o dentista, 15% apresentam dor em algum dente, sendo que todas eram mães de prematuros. Quanto ao número de vezes que faziam escovação durante o dia, 3% das mães afirmaram escovar menos de 2 vezes ao dia, sendo que 77 e 75% (para mãe de PT e AT, respectivamente) afirmaram escovar de 3 a 4 vezes ao dia. Cinquenta e um por cento das mães apresentavam sangramento durante a escovação (69% e 38% das mães de

PT e AT). Em relação ao uso de algum tipo de prótese dentária, 16% das 123 mães afirmaram usar prótese, sendo 4% mães de PT e 25% mães de AT.

Tabela 3 - Prevalência materna e as variáveis de dados socioeconômicos coletados através do questionário 1 em T0.

<i>Dados maternos</i>	GRUPOS DE CRIANÇAS		
	Total	PT	AT
	n=123 % (n)	n=53 % (n)	n=70 % (n)
<i>Raça</i>			
Branca	63% (77)	58% (30)	66% (47)
Afro-descendente	35% (43)	42% (23)	30% (20)
Outras	2% (3)	0% (0)	4% (3)
<i>Grau de instrução</i>			
Analfabeto – 1º grau completo	37% (46)	42% (23)	34% (23)
2º grau completo e/ou incompleto	58% (71)	54% (28)	61% (43)
Superior completo e/ou incompleto	5% (6)	4% (2)	5% (4)
<i>Renda familiar (em reais - R\$)</i>			
200,00 – 510,00	19% (24)	16% (9)	22% (15)
511,00 – 1200,00	45% (55)	44% (23)	45% (32)
>1201,00	36% (44)	40% (21)	33% (23)
<i>Complicações durante a gravidez</i>			
Sim	46% (56)	58% (30)	37% (26)
Não	54% (67)	42% (23)	63% (45)
<i>Realizou pré-natal</i>			
Sim	99% (122)	98% (52)	100% (70)
Não	1% (1)	2% (1)	0% (0)
<i>Medicamento durante gestação</i>			
Sim	83% (102)	71% (37)	92% (65)
Não	17% (21)	29% (16)	8% (5)
<i>Visitas regulares ao dentista</i>			
Sim	54% (66)	48% (25)	58% (40)
Não	46% (57)	52% (28)	42% (30)
<i>Dor em algum dente</i>			
Sim	23% (28)	15% (8)	28% (20)
Não	77% (95)	85% (45)	72% (50)
<i>Número de escovações durante o dia</i>			
1 vez	3% (4)	4% (2)	3% (2)
2 vezes	21% (26)	19% (10)	22% (16)
> 3 vezes	76% (93)	77% (41)	75% (52)
<i>Sangramento durante escovação</i>			
Sim	51% (63)	69% (36)	38% (27)
Não	49% (60)	31% (17)	62% (43)
<i>Usa algum tipo de prótese</i>			
Sim	16% (20)	4% (2)	25% (18)
Não	84% (103)	96% (51)	75% (52)

6.2 Dados do recém-nascido (T0- questionário 2A)

Os dados coletados no questionário 1 sobre os recém-nascidos estão representados na Tabela 4. As crianças nascidas a termo apresentaram-se com idade gestacional média de $39,2 \pm 1,23$ semanas (mediana= 39,1 valores de 37,1 a 42,5 semanas) e as prematuras, média de $34,5 \pm 2,21$ semanas (mediana= 35,5 valores entre 30 a 36 semanas).

Os prematuros nasceram em média com 2341 ± 398 gramas (mediana= 2240 variando entre 1720 e 2715 gramas) diferindo estatisticamente das crianças a termo em que o peso com média de 3245 ± 504 gramas (mediana= 3200 variando entre 1920 e 4165 gramas) (Mann-Whitney, $p < 0,001$). Também os dados de comprimento diferiram estatisticamente em PT e AT (Mann-Whitney, $p < 0,001$). Os PT apresentaram em média $44,2 \pm 2,1$ centímetros (mediana= 44,8 variando de 42 e 50 cm). Em AT o comprimento com média de $49,1 \pm 2,4$ centímetros (mediana= 50 variando entre 42 e 54 cm). Destas crianças, 13 tinham peso inferior a 2499 gramas sendo 12 prematuras. Entre os prematuros ($n=53$) 29 eram meninas e 24 meninos, com predomínio de crianças da raça branca ($n=40$).

Tabela 4 - Prevalência de recém-nascidos por grupos de nascimentos PT e AT e as variáveis de dados do recém-nascido coletados através do questionário 1 em T0.

<i>Dados do recém-nascido</i>	GRUPOS DE CRIANÇAS		
	Total n=123 % (n)	PT n=53 % (n)	AT n=70 % (n)
<i>Sexo</i>			
Feminino	52% (64)	56% (30)	49% (34)
Masculino	48% (59)	44% (23)	51% (36)
<i>Peso (g)</i>			
< 2499	10% (13)	23% (13)	1% (1)
> 2500	90% (110)	77% (40)	99% (69)
<i>Comprimento (cm)</i>			
≤ 50	75% (92)	99% (52)	58% (40)
> 50	25% (31)	1% (1)	42% (30)
<i>Raça</i>			
Branca	74% (91)	77% (40)	72% (50)
Afro-descendente	26% (32)	23% (13)	28% (20)
Outras	0% (0)	0% (0)	0% (0)
<i>Amamenta ou amamentou seu filho</i>			
Sim	52% (64)	56% (30)	49% (34)
Não	48% (59)	44% (23)	51% (36)

6.3 Dados das crianças após 3 meses (T3 – questionário 2B)

Após 3 meses (visita T3), o questionário 2 foi aplicado nas 55 mães que comparecem com os bebês à visita. O inventário de saúde envolveu questionamentos sobre o bebê a respeito da sua dieta, problemas de saúde e uso de chupetas durante os três primeiros meses de vida. Não foram detectadas diferenças entre PT e AT ($p>0.05$). Das 55 crianças, trinta e três estavam sendo alimentadas pelo leite materno. Vinte e duas estavam sendo alimentadas com leite artificial, sendo maioria prematura ($n=15$). Treze, das 55 crianças que compareceram na segunda visita tiveram problemas de saúde representados por doença respiratória (coriza nasal) e gastrointestinal (diarréia). Quanto ao uso de medicamentos, algumas mães relataram o uso de diclofenaco de potássio, anti-histamínicos e vitaminas, porém nenhuma relatou o uso de antibióticos. Apenas 25 crianças faziam uso de chupeta.

6.4 Análises laboratoriais dos níveis de imunoglobulinas, citocinas e microrganismos das amostras salivares

6.4.1 Níveis de IgA e IgM nas amostras salivares

As amostras salivares ($n=123$) da primeira visita (T0) apresentaram a concentração média de IgA salivar de $2.53\mu\text{g/ml}$ (± 6.04) sendo que a concentração de IgM foi um pouco menor apresentando a média de $1.67\mu\text{g/ml}$ (± 4.24). A concentração média de proteína total nas amostras salivares foi de $950.0\mu\text{g/ml}$ (± 741.1). Houve diferença estatisticamente significativa entre PT e AT (Mann-Whitney, $p<0,03$) em que as médias foram: $1.57\mu\text{g/ml}$ (± 2.82) e $3.13\mu\text{g/ml}$ (± 7.44) para PT e AT, respectivamente. A concentração média de IgM em crianças PT foi de $1.34\mu\text{g/ml}$ (± 4.10) não diferindo estatisticamente dos valores encontrados em crianças nascidas AT (média= $1.87\mu\text{g/ml} \pm 5.07$) (Mann-Whitney, $p=0.23$). Houve correlação positiva entre níveis de IgA e IgM em ambos grupos (correlação de Pearson: $r>0.7$; $p<0.001$). Observou-se correlação positiva entre as concentrações de IgA e IgM e proteína total das amostras (Correlação de Pearson: $r>0.81$; $p<0.001$ e $r=0,72$; $p<0.001$ respectivamente para IgA e IgM). Em crianças PT os níveis médios de IgA normalizados pelos níveis de proteínas foram de 0.16 (± 0.20) e os de AT foram de 0.37 (± 0.58) diferindo estatisticamente (Mann-Whitney, $p<0.001$). Nas crianças PT

os níveis médios de IgM normalizados foram de 0.13 ($\pm$ 0.19) e os de AT foram de 0.17 ($\pm$ 0,25) não diferindo estatisticamente (Mann-Whitney, $p=0,47$).

Na segunda visita (T3) as crianças analisadas ($n=55$) tiveram a concentração média de IgA salivar de 4.19 μ g/ml ($\pm$ 4.64) não havendo diferenças estatisticamente significantes entre as crianças PT (média=3.91 $\pm$ 4.40) e AT (média=4.40 $\pm$ 4.80) (Mann-Whitney, U-test, $p=0.4$). Os níveis médios de IgM foram de 4.52 μ g/ml ($\pm$ 5.91) também não havendo diferenças estatisticamente significantes entre as crianças PT (média=5.83 $\pm$ 6.55) e AT (média=3.54 $\pm$ 5.16) (Mann-Whitney, U-test, $p=0.3$).

Em relação ao seguimento prospectivo de T0 para T3, analisando apenas as crianças que compareceram nas duas visitas pode-se notar que os bebês prematuros alcançaram os níveis de anticorpos encontrados em crianças a termo. Houve aumento significativo da concentração de IgA nas amostras de T0 para T3 (Teste T, $p<0,001$) tanto em PT e AT. O gráfico 1 abaixo mostra os níveis médios de IgA e os valores normalizados pela quantidade de proteínas das amostras salivares analisadas em T0 e T3 ($n=55$) divididos entre PT ($n=25$) e AT ($n=30$). Em T3 os níveis de IgA nas amostras das crianças PT apresentaram concentração média de 3.91 μ g/ml ($\pm$ 4.40) sendo estatisticamente diferentes (Mann-Whitney, $p<0,02$) do valor encontrado em T0, em que a concentração média foi de 1.42 μ g/ml ($\pm$ 2.48). As crianças AT apresentaram concentração média de IgA de 4.40 μ g/ml ($\pm$ 4.80), sendo superior a encontrada em T0, concentração média 2.04 μ g/ml ($\pm$ 2.30) e estatisticamente diferente (Mann-Whitney, $p<0,02$). Estes valores quando normalizados pela quantidade de proteínas, em PT foram de 1.42 ($\pm$ 2.13) diferindo estatisticamente dos valores encontrados em T0, média 0.14 ($\pm$ 0.15) (Teste T, $p<0,02$) e os de AT foram de 1.58 ($\pm$ 2.0) diferindo estatisticamente dos valores de T0, média 0.14 ($\pm$ 0.18) (Teste T, $p<0,001$). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os valores encontrados para PT e AT em T3 (Mann-Whitney, $p=0,5$).

Gráfico 1 - Níveis médios de IgA nas amostras salivares das crianças em T0 e T3. Os traços pretos hachurados ou não indicam os níveis de IgA normalizados pelos níveis de proteínas.

Os valores de concentração de IgM em T3 também aumentaram em relação a T0 (Gráfico 2), sendo que em prematuros esta diferença foi mais acentuada. A concentração média de IgM nas amostras das crianças PT foi de $5.83\mu\text{g/ml}$ (± 6.55), sendo estatisticamente diferentes dos níveis encontrados em T0, média $1.47\mu\text{g/ml}$ (± 2.69) (Mann Whitney, $p < 0,01$). As crianças AT apresentaram a concentração média de IgM de $3.54\mu\text{g/ml}$ (± 5.16) havendo diferença estatisticamente significativa de T0 em que a média foi de $0.95\mu\text{g/ml}$ (± 1.16) (Mann Whitney, $p < 0,01$). No entanto, em T3 não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores encontrados entre AT e PT (Mann-Whitney, $p = 0,31$). Em PT os níveis médios de IgM normalizados foram de 2.14 (± 3.39) e os de AT foram de 0.98 (± 1.14) não diferindo estatisticamente (Mann-Whitney, $p = 0,12$) entre os grupos.

Gráfico 2 - Níveis médios de IgM nas amostras salivares das crianças em T0 e T3. Os traços pretos hachurados ou não indicam os níveis de IgM normalizados pelos níveis de proteínas.

6.4.2 Níveis de interleucinas: IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- γ nas amostras salivares

O Gráfico 3 abaixo representa a flutuação dos níveis médios de interleucinas nas amostras coletadas em T0 e T3. A distribuição das médias, medianas e frequência de detecção positiva de cada citocina em T0 e T3 nos grupos de PT e AT estão mostrados na Tabela 5 abaixo.

Gráfico 3 - Análise da flutuação dos níveis médios de interleucinas nas amostras coletadas em T0 e T3.

Tabela 5 - Distribuição de média, desvio padrão (SD), os níveis medianos e frequência de crianças com detecção positiva das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-12 e IL-6 em 25 pares de AT e PT na primeira visita (T0) e após três meses (T3) em amostras de saliva de crianças estudadas.

<i>Citocinas</i>	T0		T3	
	PT	AT	PT	AT
IFN				
<i>Média</i>	4.67*	0.17*	6.88*	0.00*
<i>DP</i>	9.16	0.57	12.17	0.00
<i>Mediana</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Número de crianças com resposta positiva(%)</i>	12 (48)**	2 (8)**	8 (32)**	0 (0)**
IL10				
<i>Média</i>	17.03*	4.25*	6.10	5.85
<i>DP</i>	14.79	5.53	11.16	6.64
<i>Mediana</i>	18.65	0.00	0.00	4.56
<i>Número de crianças com resposta positiva(%)</i>	21 (84)**	12 (48)**	12 (48)**	19 (76)**
IL12				
<i>Média</i>	15.60*	7.34*	4.37	2.06
<i>DP</i>	11.87	8.64	8.66	2.45
<i>Mediana</i>	13.53	3.80	0.00	1.09
<i>Número de crianças com resposta positiva(%)</i>	25 (100)**	20 (80)**	12 (48)	15 (60)
IL6				
<i>Média</i>	21.60*	18.18*	2.49	2.03
<i>DP</i>	29.50	37.63	4.11	2.50
<i>Mediana</i>	9.88	4.88	0.00	1.89
<i>Número de crianças com resposta positiva(%)</i>	25 (100)	25 (100)	12 (48)**	19 (76)**

*Diferença estatisticamente significativa (teste de Mann-Whitney, $P < 0,05$)

**Diferença estatisticamente significativa (Qui quadrado, $P < 0,05$, $q > 0,50$)

Na primeira visita (T0), a quantificação de IFN- γ , IL-10, IL-12 e IL-6 foram significativamente maiores no prematuro do que em crianças a termo (Mann-Whitney, $P < 0,05$). Houve diferenças significativas entre os grupos em relação à frequência de crianças com detecção positiva para IFN- γ , IL-10, IL-12 (Teste Qui Quadrado, $q > 7,01$; $P < 0,05$), em que, pré-termo apresentaram níveis mais frequentemente detectáveis dessas interleucinas. Em ambos grupos todas as crianças apresentaram a IL-6 em amostras de salivas. Houve correlação positiva entre a IL-12 com todas as outras interleucinas (Correlação de Spearman, $r > 0,56$; $P < 0,05$) no pré-termo, que não aconteceu em crianças a termo. Não houve correlação entre os níveis de interleucinas e imunoglobulinas A e M em ambos os grupos (Correlação de Spearman, $r < 0,11$, $P > 0,05$).

Em T3 não houve diferenças estatisticamente significante entre os grupos nos níveis médios das interleucinas: IL-10, IL-12 e IL-6 (Mann-Whitney, $P > 0,05$). Por outro lado, os PT apresentaram níveis médios maiores de IFN- γ (Mann-Whitney, $P > 0,05$) do que no grupo a termo, entretanto, as doses vacinais não foram verificadas. As citocinas IL-6 e IL-10 foram significativamente mais detectadas no AT ($n=19$) do que no PT ($n=12$) (Qui quadrado, $q=6,2$, $P < 0,05$).

Diferentemente, todas as crianças do grupo AT não apresentaram níveis detectáveis de IFN- γ , enquanto 8 crianças PT tiveram resposta positiva para IFN- γ (Qui Quadrado, $q=11,5$; $P < 0,01$). Não houve diferenças significativas no número de PT ($n=13$) e AT ($n=10$) de crianças com IL-12 não detectável (Qui quadrado, $q=0,03$; $P > 0,54$). Foram verificadas associações positivas entre os níveis de IL-10 e IL-12 em ambos os grupos (Correlação de Spearman, $r > 0,56$; $P < 0,05$). Não houve associação entre os níveis de interleucinas e imunoglobulinas A e M, em ambos os grupos (Correlação de Spearman, $r < 0,08$; $P > 0,05$).

A análise prospectiva mostrou que em PT os níveis de interleucinas diminuíram significativamente de T0 para T3 (Mann-Whitney, IL-10: $P=0,009$, IL-12: $P=0,001$, IL-6: $P=0,001$), o que não aconteceu com os níveis de IFN- γ que aumentaram (Mann-Whitney: $P=0,03$). No grupo de crianças AT houve diferença estatisticamente significante com diminuição dos níveis médios de IL-12 e IL-6 de T0 para T3 (Mann-Whitney, $P < 0,05$). Para as outras citocinas IL-10 e IFN- γ não foram encontradas diferenças significativas entre as visitas (Mann-Whitney, $P > 0,11$).

6.4.3 Correlação entre dados clínicos dos prontuários com os níveis de citocinas

Das entrevistas e avaliações clínicas observadas através da análise dos questionários e prontuários do HC/FMRP, permitiu-se coletar alguns dados diversos sobre a saúde materna durante a gestação, parto e desenvolvimento clínico do recém-nascido após o nascimento. Estes dados permitiram saber se o recém-nascido foi submetido a algum tipo de estresse (tal como hipoglicemia, o tempo de ruptura de membrana $>$ que 18 horas) e/ou de contato com a infecção bacteriana na vida intrauterina (como corioamnionite materna e infecção urinária) ou após o nascimento. Esses dados foram correlacionados com os níveis de interleucinas encontrados nas salivas coletadas em T0.

Os resultados obtidos através da avaliação desses prontuários mostraram que no grupo PT, seis e doze crianças apresentaram infecção bacteriana respectivamente por bactérias gram-positivas (estafilococos e estreptococos) e estresse após o nascimento. Doze mães de PT apresentaram infecção durante a gravidez, como infecção urinária e corioamnionite. Enquanto no grupo AT, apenas 2 crianças apresentaram infecção bacteriana após o nascimento e os outros três tinham mãe com infecção durante o período de gestação. Houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos do PT e AT em relação ao contato com a infecção ($n=11$ e 3 , PT e AT, respectivamente, Qui-quadrado, $P<0,05$, $q=6,34$) e estresse após o nascimento ($n = 12$ e 2 , PT e AT, respectivamente, Qui-quadrado, $P <0,05$, $q = 9,92$).

A análise de correlação entre a frequência dos dados clínicos e os níveis de interleucinas mostrou que no grupo PT, houve uma associação positiva entre os níveis de IL-6 com frequência de crianças que apresentaram o stress (Mann-Whitney, $P<0,05$) e IL-10 com infecção após o nascimento (Mann -Whitney, $P <0,05$). Em AT, apenas, houve associação positiva entre os níveis de IL-10 com a infecção (correlação de Spearman, $P <0,05$).

6.4.4 Níveis de espécies bacterianas detectadas nas amostras salivares

A efetividade da técnica foi testada em ensaios cruzando as sondas com os DNA extraídos e purificados para cada uma das espécies e também com uma saliva de uma criança-teste de 5 meses de idade (Figura 3 – item 4.7.6). Entretanto, os resultados dos ensaios de *Checkerboard* não conseguiram detectar nenhuma das espécies selecionadas nas amostras salivares logo ao nascimento (T0) e nem aos 3 meses de idade (T3).

A Figura 6 abaixo mostra o resultado encontrado de 48 amostras testadas contra os vinte tipos distintos de microrganismos.

Figura 6 - Ensaio de *Checkerboard* nas amostras salivares de crianças nascidas AT e PT.

7 DISCUSSÃO

Os fatores de risco associados ao nascimento prematuro e os seus efeitos durante a vida e o desenvolvimento dos neonatos são alvos de inúmeras pesquisas. Pouco se sabe sobre o desenvolvimento do sistema imune de mucosa no início da vida, especialmente em prematuros, que reconhecidamente apresentam uma imaturidade imunológica ao nascer. Daí a importância do presente estudo que buscou evidências, através da análise de saliva da ontogenia do sistema imune de mucosas em crianças nascidas a termo e prematuras. Para isto, foram obtidos dados socioeconômicos e de saúde geral através de questionários, além de coletas de amostras salivares de crianças PT e AT, em dois momentos com intervalos de três meses para realização de imuno-ensaios que permitiram a determinação dos níveis de anticorpos IgA e IgM, quantificação de citocinas: IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- γ e de 20 espécies bacterianas.

Na busca de maiores informações que pudessem sugerir tais diferenças entre os grupos, a análises dos prontuários clínicos permitiram uma avaliação sobre condições de infecção que o recém-nascido foi ou está sendo submetido, ou até mesmo situações de estresse, como por exemplo, hipoglicemia, tempo de ruptura de bolsa, entre outros fatores.

Em humanos, os plasmócitos secretores de IgA compreendem 50 a 75% de todas as células secretoras de anticorpos, sendo esta classe de anticorpo continuamente secretada nos fluídos gastrointestinais, saliva, lágrimas, urina e outras secreções (BRANDTZAEG, 1984). A IgAs é o principal componente do sistema imune adaptativo de mucosas, consistindo da forma dimérica de IgA associada ao componente secretor das células epiteliais através das quais a IgA dimérica sofre transcitose para atingir as secreções (SMITH, 2002). As funções principais da IgAs consistem na neutralização de componentes virais e bacterianos envolvidos na virulência e bloqueio de receptores importantes para a aderência e invasão dos tecidos. Amostras de saliva total apresentam IgAs, mas também IgG, IgM e IgA séricas, as quais atingem a cavidade bucal, principalmente através do fluído crevicular. Por volta dos 9 meses de idade, observa-se que mais de 95% da IgA presente na saliva encontra-se na forma de IgAs, embora em níveis bem inferiores aos detectados em adultos (SMITH; TAUBMAN, 1990). Os níveis totais de IgA salivar tem sido considerados como um indicador do grau de maturidade do sistema imune de mucosas em crianças (GLEESON; CRIPPS; CLANCY, 1995; NOGUEIRA *et al.*, 2005). Reduções transitórias nos níveis de IgA detectados na saliva foram associadas à maior susceptibilidade a infecções do trato respiratório (GLEESON;

CRIPPS; CLANCY, 1995), reforçando a importância da maturação sistema imune de mucosas na susceptibilidade à infecções.

Em adultos, as concentrações de IgA na saliva variam entre 72 a 410µg/ml (BRANDTZAEG, 1989; WAN *et al.*, 2003). Entre crianças da faixa etária entre 6,5 a 12 anos, observou-se uma concentração média de IgA de 201µg/ml. Níveis inferiores, entre 0 a 50µg/ml de IgA, média: 22.4µg/ml ($\pm 7,3$) foram detectados nas salivas de crianças de 6 a 18 meses de idade, os quais aumentam com a idade (WAN *et al.*, 2003). Estudos anteriores demonstraram níveis médios de IgA nas salivas de crianças de 5 meses de aproximadamente 80µg/ml (NOGUEIRA *et al.*, 2005), superiores às detectadas que apresentaram uma média 3.1 e 4.2µg/ml para T0 e T3 respectivamente na faixa etária estudada (0 a 3 meses de vida) o que está de acordo com o desenvolvimento e maturação do sistema imune de mucosas devido ao aumento do contato com antígenos o que possibilita um aumento na produção de anticorpos (WAN *et al.*, 2003).

Diferentemente de Seidel e colaboradores (2000) que observaram que 25% das crianças a termo com 1 dia vida não apresentavam níveis detectáveis de IgA nas amostras salivares coletadas, todas as crianças analisadas apresentaram níveis de IgA detectáveis em T0 (0 dia de vida) e em T3. Além disto, os níveis de IgA de crianças AT foram cerca de 2,0 vezes superiores aos níveis encontrados em PT nos primeiros dias de vida (T0) o que diferiu dos resultados de Seidel e colaboradores (2000) em que os níveis foram semelhantes entre os PT e AT. Um estudo longitudinal de Wan e colaboradores (2003), estudou bebês do nascimento aos 18 meses de idade mostrou que a ausência de IgA nas salivas foi mais frequente entre crianças prematuras (69%) do que em crianças a termo (56%), o que não aconteceu com os níveis de IgG e IgM. Os níveis de IgA salivar encontrados no presente estudo em crianças AT foram semelhantes aos valores encontrados por Maruyama e colaboradores (2009). Estes dados sugerem que crianças prematuras podem ter um atraso na resposta de anticorpos IgA em fases muito iniciais do desafio antigênico. Curiosamente, os níveis de IgM não parecem ser afetados pelo nascimento prematuro.

Estudos anteriores mostraram que crianças de 5 meses de idade apresentaram uma razão entre níveis de IgA pelo de IgM de 19,6 (NOGUEIRA *et al.*, 2005), enquanto no presente estudo a proporção foi de 0,7 em neonatos. Esses resultados mostram que os níveis de IgM foram proporcionalmente maiores na saliva no nascimento do que após 5 meses de idade. Sabe-se que variações no fluxo salivar influenciam diretamente nas concentrações destes anticorpos. Estas interferências são normalmente controladas pela normalização das

medidas de IgA pelas concentrações de proteína total na saliva. As variações nos níveis de IgA entre os grupos mantiveram-se mesmo quando corrigidos pelas concentrações de proteína total.

Deficiências nas concentrações de IgA salivar em crianças parecem ser compensadas pela produção e secreção de IgM em crianças de maior idade e adultos (FERNANDES *et al.*, 1995, GLEESON; CRIPPS; CLANCY, 1995). Entretanto, este mecanismo compensatório não foi observado em crianças durante os primeiros dois anos de vida (GLEESON; CRIPPS; CLANCY, 1995, NOGUEIRA *et al.*, 2007). Pouco se sabe sobre a relação entre IgM e IgA na faixa etária estudada, o que pode ser um dado importante para o entendimento da ontogenia do sistema imune de mucosas. A maioria das crianças que apresentaram níveis de IgM superiores ao de IgA, eram prematuras, o que pode ser um dado importante para o entendimento da maturação e desenvolvimento das imunoglobulinas presentes na cavidade bucal. As crianças prematuras parecem ter recuperado seus níveis de imunoglobulinas acelerando seu processo de produção destes anticorpos, ou seja, em PT, de T0 para T3 os níveis de aumentaram cerca de 2,5 e 4,4 vezes, enquanto que em AT houve um aumento de 1,4 e 1,3 vezes para IgA e IgM respectivamente.

Embora alguns estudos tenham identificado na cavidade oral de crianças com 1 mês de vida, *S. mitis* (SMITH; TAUBMAN, 1990; PEARCE *et al.*, 1995), os ensaios de *Checkerboard* do presente estudo não foram capazes de detectar nenhuma das 20 espécies testadas. As razões para tais diferenças, precisam ser melhor analisadas através do emprego de outras técnicas para efeito comparativo, como por exemplo a utilização de métodos culturais em que espécies pioneiras da cavidade bucal puderam ser identificadas (SMITH; TAUBMAN, 1990; PEARCE *et al.*, 1995). Também poderiam ser testados volumes maiores de amostras para que a quantidade de DNA fosse superior ao limite de detecção que foi de 10ng, o que não foi possível, pois as amostras tinham volumes reduzidos para que todas as técnicas de imuno-ensaios, que eram o objetivo principal do presente estudo, pudessem ser realizadas.

A identificação de biomarcadores do *status* da resposta imunológica, principalmente em crianças recém-nascidas, por exemplo, através da detecção de citocinas, pode dar indícios sobre sua susceptibilidade a inúmeras infecções. Muitos estudos vêm sendo empregados através do uso de amostras salivares, para obter-se biomarcadores de diversas doenças como forma de diagnóstico rápida e segura para o paciente, isto por que a saliva apresenta níveis satisfatórios de imunoglobulinas, citocinas e peptídeos antimicrobianos

(ROHAN *et al.*, 2000; NURKKA *et al.*, 2001) o que permite correlacionar a saúde bucal como uma janela para a saúde sistêmica. Os estudos que abordam os níveis de interleucinas em amostras salivares são escassos, sendo que os poucos são em adultos com doença periodontal (TELES *et al.*, 2009).

Assim como para as imunoglobulinas, os níveis de citocinas também foram diferentes entre PT e AT, especialmente em T0 em que os valores médios e a frequência de detecção das citocinas foram superiores em PT. Há pouca informação na literatura com relação às citocinas em salivas, especialmente em recém-nascidos. Sendo assim, as razões para tais resultados foram baseadas em estudos envolvendo, principalmente análises de citocinas em amostras de soro e plasma humanos (CHIESA *et al.*, 2003, NACCASHA *et al.*, 2001)

Primeiramente, tais diferenças poderiam estar relacionadas com desafio infeccioso ao quais os neonatos podem ser submetidos, já que alguns microrganismos parecem induzir a produção de citocinas específicas, por exemplo, gram-negativos induzem a produção de IL-10, mas não IL-12, e IFN- γ em células mononucleares, enquanto que algumas bactérias gram-positivas (ex. *S. mutans*) estimulam produção de altos níveis de IL-12 e IFN- γ , mas não IL-10 (MASON; POWRIE, 1998; JIANG; MAGLI; RUSSO, 1999, HAHN; BEST; TEW, 2000). A ausência de níveis detectáveis de espécies bacterianas na cavidade bucal, associado com o tempo mínimo de exposição a antígenos nas primeiras horas de vida e a diminuição dos níveis detectados destas imunoglobulinas em T3, fortalece a idéia de que os níveis de interleucinas encontrados em amostras salivares não são reflexos da estimulação microbiana local e sim possivelmente de condições sistêmicas em que o neonato foi ou está sendo submetido. Daí a importância de uma abordagem das condições sistêmicas do recém-nascido.

Estudos mostram que o aumento dos níveis de IL-10 no soro foram detectados em recém-nascidos prematuros com sepse (CANCELIER *et al.*, 2009; ROMAGNOLI *et al.*, 2001) da mesma forma que a IL-6 no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos com sepse neonatal (CHIESA *et al.*, 2003; YOON *et al.*, 2000). Assim, IL-6 e IL-10 são importantes biomarcadores inflamatórios de sepse neonatal no soro (BENDER *et al.*, 2008). Aqui, os níveis de IL-10 na saliva apresentou associação positiva com crianças que apresentaram algum tipo de contato com um quadro de infecção microbiana. Deste modo, os níveis aumentados destas citocinas poderiam ser reflexos das condições da sua vida intrauterina que puderam levar ao nascimento precoce, já que a ruptura precoce da membrana amniótica pode ser fruto de uma resposta inflamatória frente a um desafio microbiano.

Os resultados também mostraram uma correlação positiva entre os níveis de IL-6 e estresse nos PT, que está em acordo com um estudo com crianças de 8-9 anos de idade, que sofreram algum tipo de estresse, tais como a privação do sono, que mostrou aumento dos níveis de IL-6 em salivas, quando comparados com aqueles não sob stress (REDWINE *et al.*, 2000). Um estudo de Keller e colaboradores (2010) indicaram que os níveis mais elevados de IL-6 salivar foram associados com a saúde mental da criança (por exemplo, depressão e ansiedade).

Assim, o presente estudo contribuiu, em parte, para a compreensão da ontogenia do sistema imune da mucosa no início da vida, mostrando que prematuros conseguem alcançar níveis similares de imunoglobulinas de mucosas que crianças nascidas a termo, já aos 3 meses de vida, entretanto há necessidade de comparações longitudinais envolvendo os níveis de imunoglobulinas e citocinas em amostras de salivas de lactentes PT ou não, a fim esclarecer a extensão de tais diferenças e se esta é mantida ao longo do tempo. Embora os objetivos do presente estudo não incluíssem a análise das causas de prematuridade, os dados clínicos permitiram sugerir que a infecção e o estresse podem alterar os níveis de citocinas na cavidade oral, especialmente em crianças do PT, que estavam mais sujeitas a estímulos infecciosos e situações de estresse. Além disso, os resultados foram semelhantes aos encontrados em amostras de sangue o que confirma a necessidade de estudos longitudinais sobre o sistema imune da mucosa, utilizando de saliva como fonte de diagnóstico rápido e não invasivo o que pode representar um "espelho de corpo" saúde e doença desde saliva tem níveis satisfatórios de imunoglobulinas, citocinas e antimicrobianos peptídeos.

8 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que:

- Os níveis de imunoglobulinas salivares aumentam do nascimento aos 3 meses de vida;
- Crianças prematuras apresentam diferenças tanto nas concentrações de IgA e citocinas IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- γ em relação aos neonatos a termo, especialmente em T0.
- Os níveis de IgA foram inferiores em PT ao nascimento o que não aconteceu após 3 meses de vida, quando estas crianças parecem recuperar sua condição imunológica;
- Os níveis e a frequência de detecção de citocinas salivares foram superiores em prematuros o que pode ser reflexo das condições de seu desenvolvimento intrauterino e na vida pós-natal, de acordo com um maior desafio infeccioso e condições de estresse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S.P. **Imunologia Celular e Molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AINÉ, L.; BACKSTROM, M.C.; MAKI, R.; KUUSELA, A.L.; KOIVISTO, A.M.; IKONEN, R.S.; MAKI, M. **Enamel defects in primary and permanent teeth of children born prematurely**. J Oral Pathol Med. 2000 Sep; 29(8):403-9.

ALVES, A.C.; NOGUEIRA, R.D.; STIPP, R.N.; PAMPOLINI, F.; MORAES, A.B.; GONÇALVES, R.B.; HÖFLING, J.F.; LI, Y.; MATTOS-GRANER, R.O. **Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children**. J Med Microbiol. 2009;58:476-478.

ARAGÃO, V.M.F. **Fatores de risco para restrição do crescimento intra-uterino: comparação entre duas coortes de duas cidades brasileiras**. Ribeirão Preto, 2003. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP.

BENDER, L.; THAARUP, J.; VARMING, K.; KRARUP, H.; ELLERMANN-ERIKSEN, S.; EBBESEN, F. **Early and late markers for the detection of early-onset neonatal sepsis**. Dan Med Bull. 2008; 55(4):219-223.

BERKOWITZ, R.J.; TURNER, J.; GREEN, P. **Primary oral infection of infants with *Streptococcus mutans***. Arch Oral Biol. 1980; 25:221-224.

BETTIOL, H.; RONA, R.J.; CHINN, S.; GOLDANI, M.; BARBIERI, M.A. **Factors associated with preterm births in Southeast Brazil: a comparison of two birth cohorts born 15 years apart**. Paediatr Perinatal Epidemiol. 2000; 14: 30-8.

BOYAKA, P.N.; LILLARD, J.W. JR.; MCGHEE, J. **Interleukin 12 and innate molecules for enhanced mucosal immunity**. Immunol Res. 1999; 20(3):207-17.

BRADNEY, C.P.; SEMPOWSKI, G.D.; LIAO, H.X.; HAYNES, B.F.; STAATS, H.F. **Cytokines as adjuvants for the induction of anti-human immunodeficiency virus peptide immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies in serum and mucosal secretions after nasal immunization**. J. Virol. 2002 Jan; 76(2):517-24.

BRANDTZAEG, P. **Overview of the mucosal immune system with special emphasis on its relation to dental caries**. Proc Finn Dent Soc 1984; 79:71-84.

BRANDTZAEG, P. **Overview of the mucosal immune system**. Curr Top Microbiol Immunol. 1989; 146:13-25.

BRANDTZAEG, P.; FARSTAD, I.N.; HARALDSEN, G.; JAHNSEN, F.L. **Cellular and molecular mechanisms for induction of mucosal immunity**. Dev Biol Stand.1998;92:93-108.

CANCELIER, A.C; PETRONILHO, F.; REINKE, A.; CONSTANTINO, L.; MACHADO, R.;RITTER, C.; DAL-PIZZOL, F. **Inflammatory and oxidative parameters in cord blood**

as **diagnostic of early-onset neonatal sepsis: a case-control study**. *Pediatr Crit Care Med*. 2009; 10: 467–471. Find this article online

CARLSSON, J.; GRAHNEN, H.; JONSSON, G. **Lactobacilli and streptococci in the mouth of children**. *Caries Res*. 1975; 9:333-339.

CAUFIELD, P.W.; CUTTER, G.R; DASANAYAKE, A.P. **Initial acquisition of *mutans streptococci* by infants: evidence for a discrete window of infectivity**. *J Dent Res*. 1993; 72:37-45.

CAUFIELD, P. W.; DASANAYAKE, A. P.; LI, Y.; PAN, Y.; HSU, J.; HARDIN, J.M. **Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity**. *Infect Immun*. 2000; 68:4018-4023.

CHIESA, C.; PELLEGRINI, G.; PANERO, A.; OSBORN, J.F.; SIGNORE, F.; ASSUMMA, M.; PACIFICO, L. **C-Reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection**. *Clin Chem*. 2003; 49:60-8.

CLAPP, DW. **Developmental regulation of the immune system**. *Semin Perinatol*. 2006; Apr; 30(2):69-72.

DASANAYAKE, A.P.; BOYD, D.; MADIANOS, P.N.; OFFENBACHER, S.; HILLS, E. **The association between *Porphyromonas gingivalis*-specific maternal serum IgG and low birth weight**. *J. Periodontol*. 2001 Nov; 72(11):1491-7.

FERNANDES; F.R.; NAGAO, A.T.; MAYER, M.P.; ZELANTE, F.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. **Compensatory levels of salivary IgM anti-*Streptococcus mutans* antibodies in IgA-deficient patients**. *J. Investig Allergol Clin Immunol*. 1995; 5:151-155.

FITZSIMMONS, S.P.; EVANS, M.K.; PEARCE, C.L.; SHERIDAN, M.J.; WIENTZEN, R.; COLE, M.F. **Immunoglobulin A subclasses in infants saliva and in saliva and milk from their mothers**. *J Pediatr*. 1994; 124:566-573.

FONG, Y. L. L.; MOLDAWER, M.; MARANO, H.; WEI, S. B.; TATTER, R. H.; CLARICK, U.; SANTHANAM, D.; SHERRIS, L. T.; MAY, P. B.; SEHGAL, AND S. F. LOWRY. **Endotoxemia elicits increased circulating 02-IFN/IL-6 in man**. *J. Immunol*. 1989; 142:2321-2324.

GALLIN, J.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. 3rd edition, Philadelphia, Lippincott William and Wilkins, 1999.

GAMONAL, J.; ACEVEDO, A.; BASCONES, A.; JORGE, O.; SILVA, A. **Levels of Interleukin- 1 β , -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment**. *J. Periodontol*. 2000; 10:1536-1546.

GATELY, M.K.; RENZETTI, L.M.; MAGRAM, J.; STERN, A.S.; ADORINI, L.; GUBLER, U.; PRESKY, D.H. **The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses**. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16:495-521.

GLEESON, M.; CRIPPS, A.W.; CLANCY, R.L.; HENSLEY, M.J.; DOBSON, A.J.; FIRMAN, D.W. **Breast feeding conditions a differential developmental pattern of mucosal immunity.** Clin Exp Immunol. 1986; 66:216-222.

GLEESON, M.; CLANCY, R.L.; CRIPPS, A.W.; HENRY, R.L.; HENSLEY, M.J.; WLODARCZYK, J.H. **Acquired IgA deficiency.** Pediatr Allergy Immunol. 1994 Aug;5(3):157-61.

GLEESON, M.; CRIPPS, A.W.; CLANCY, R.L. **Modifiers of the human mucosal immune system.** Immun Cell Biol. 1995; 73: 397-404.

HACK, M.; TAYLOR, H.G.; KLEIN, N.; EIBEN, R.; SCHATSCHNEIDER, C.; MERCURI-MINICH, N. **School-age outcomes in children with birth weights under 750g.** New Engl J Med. 1994; 331: 753-9.

HAHN, C.L.; BEST, A.M.; TEW, J.G. **Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis.** Infect Immun. 2000, Dec; 68(12):6785-9.

HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, S.M. **Current status of mucosal vaccine against dental caries.** Oral Microbiol Immunol. 1999; 14:1-20.

HAYES, J.A.; ADAMSON-MACEDO, E.N.; PERERA, S.; ANDERSON, J. **Detection of secretory immunoglobulin A (SIgA) in saliva of ventilated and non-ventilated preterm neonates.** Neuro Endocrinol Lett. 1999;20:109-13.

HILL, G.B. **Preterm birth: associations with genital and possibly oral microflora.** Ann Periodontol. 1998 Jul;3(1):222-32.

HOHWY, J.; REINHOLDT, J.; KILIAN, M. **Population dynamics of *Streptococcus mitis* in its natural habitat.** Infect Immun. 2001; Oct; 69(10):6055-63.

JIANG, Y.; MAGLI, L.; RUSSO, M. **Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo.** Infect Immun. 1999, May; 67(5):2125-30.

JOHNSON, R.B.; SERIO, F.G. **Interleukin 18 concentrations and the pathogenesis of periodontal disease.** J Periodontol. 2005; 5:785-790.

JOHRI, A.K.; PAOLETTI, L.C.; GLASER, P.; DUA, M.; SHARMA, P.K.; GRANDI, G.; RAPPUOLI, R. **Group B streptococcus: global incidence and vaccine development.** Nat. Rev. Microbiol. 2006; 4:932-942.

JORDAN, H.T.; FARLEY, M.M.; CRAIG, A.; MOHLE-BOETANI, J.; HARRISON, L.H.; PETIT, S.; LYNFIELD, R.; THOMAS, A.; ZANSKY, S.; GERSHMAN, K.; ALBANESE, B.A.; SCHAFFNER, W.; SCHRAG, S.J. **Revisiting the need for vaccine prevention of late-onset neonatal group B streptococcal disease: a multistate, population-based analysis.** Pediatr. Infect. Dis. J. 2008; 27:1057-1064.

KELLER, P.S.; EL-SHEIKH, M.; VAUGHN, B.; GRANGER, D.A. **Relations between mucosal immunity and children's mental health: the role of child sex.** *Physiol Behav.* 2010;101(5):705-12.

KLEIN, M.I.; FLORIO, F.M.; PEREIRA, A.C.; HOFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. **Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children.** *J. Clin Microbiol.* 2004; 42:4620-4626.

KLIEGMAN, R.M.; ROTTMAN, C.J.; BEHRMAN, R.E. **Strategies for the prevention of low birth weight.** *Am J Obstet Gynecol.* 1990 Apr; 162(4):1073-83.

KOHLER, B.; ANDREEN, I. **Influence of caries-preventive measures in mothers on cariogenic bacteria and caries experience in their children.** *Arch Oral Biol.* 1994; 39:907-911.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.R.; FAUSTO, N. ROBBINS E COTRAN – **Patologia: Bases Patológicas das doenças.** 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.

KUBY, J.; RICHARD, A.G.; THOMAS, J.K.; BARBARA, A.O. **Immunology.** 3ed. New York: W. H. Freeman, 1999.

LAI, P.Y.; SEOW, W.K.; TUDEHOPE, D.I.; ROGERS, Y. **Enamel hypoplasia and dental caries in very-low birth weight children: a case-controlled, longitudinal study.** *Pediatr Dent.* 1997 Jan-Feb;19(1):42-9.

LAW, V.; SEOW, W.K. **A longitudinal controlled study of factors associated with *mutans streptococci* infection and caries lesion initiation in children 21 to 72 months old.** *Pediatr Dent.* 2006 Jan-Feb;28(1):58-65.

LI, Y.; CAUFIELD, P.W. **The fidelity of initial acquisition of *mutans streptococci* by infants from their mothers.** *J Dent Res* 1995; 74:681-685.

LI, Y., WANG, W.; CAUFIELD, P.W. **The fidelity of *mutans streptococci* transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families.** *Caries Res* 2000; 34: 123-132.

LOESCHE, W.J. **Bacterial mediators in periodontal disease.** *Clin Infect Dis.* 1993 Jun;16 Suppl 4:S203-10.

LOESCHE, W.J. **Association of the oral flora with important medical diseases.** *Curr Opin Periodontol.* 1997;4:21-8.

LOPES, F.F.; CUTRIM, M.C.F.N. **Imunologia do líquen plano oral – parte II- Moléculas de adesão, citocina e imunidade humoral.** *Revista da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo.* 2001; 6(1):11-13.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M.C. **Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62:71-109.

MARUYAMA, K.; HIDA, M.; KOHGO, T.; FUKUNAGA, Y. **Changes in salivary and fecal secretory IgA in infants under different feeding regimens.** *Pediatr Int.* 2009; 51:342-345.

MASON, D.; POWRIE, F. **Control of immune pathology by regulatory T cells.** *Curr Opin Immunol.* 1998 Dec; 10(6):649-55.

MATSUZAKI, N. F.; SAJI, T.; KAMEDA, K.; YOSHIZAKI, T.; OKADA, K.; SAWAI, AND TANIZAWA. **In vitro and in vivo production of interleukin-6 by fetal mononuclear cells.** *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1990; 55:305-314.

MATTOS-GRANER, R. O.; CORREA, M.S.; LATORRE, M.R.; PERES, R.C.; MAYER, M.P. ***Mutans streptococci* oral colonization in 12-30-month-old Brazilian children over a one-year follow-up period.** *J. Public Health Dent.* 2001a; 61:161-167.

MCGAW, T. **Periodontal disease and preterm delivery of low-birth-weight infants.** *J Can Dent Assoc.* 2002, Mar; 68(3):165-9.

MCGHEE, J.R.; MESTECKY, J.; DERTZBAUGH, M.T.; ELDRIDGE, J.H.; HIRASAWA, M.; KIYONO, H. **The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development.** *Vaccine.* 1992; 10(2):75-88.

MEIROVITZ, A.; KUTEN, M.; BILLAN, S.; ABDAH-BORTNYAK, R.; SHARON, A.; PERETZ, T.; SELA, M.; SCHAFFER, M.; BARAK, V. **Cytokines levels, severity of acute mucositis and the need of PEG tube installation during chemo-radiation for head and neck cancer: a prospective pilot study.** *Radiat Oncol.* 2010; 25:5-16.

MICHALEK, S.M.; KATZ, J.; CHILDERS, N.K.; MARTIN, M.; BALKOVETZ, D.F. **Microbial/host interactions: mechanisms involved in host responses to microbial antigens.** *Immunol Res.* 2002; 26:223-234.

MICHETTI, P.; MAHAN, M.J.; SLAUCH, J.M.; MEKALANOS, J.J.; NEUTRA, M.R. **Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*.** *Infect Immun.* 1992; 60:1786-1792.

MONTEIRO, C.A.; D'AQUINO BENICIO, M.H.; ORTIZ, L.P. **Tendência secular do peso ao nascer na cidade de São Paulo (1976-1998).** *Rev Saúde Pública* 2000; 34 (suppl. 6): 26-40.

NACCASHA, N.; HINSON, R.; MONTAG, A.; ISMAIL, M.; BENTZ, L.; MITTENDORF, R. **Association between funisitis and elevated interleukin-6 in cord blood.** *Obstet Gynecol.* 2001; 97:220-4.

NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Oral microbiology and immunology.** 2 ed, Philadelphia, 1994.

NOGUEIRA, R.D.; ALVES, A.C.; NAPIMOGA, M.H.; SMITH, D.J.; MATTOS-GRANER, R.O. **Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection.** *Infect Immun.* 2005; Sep; 73(9):5675-84.

NOGUEIRA, R.D.; ALVES, A.C.; KING, W.F.; GONCALVES, R.B.; HÖFLING, J.F.; SMITH, D.J.; MATTOS-GRANER, R.O. **Age-specific salivary immunoglobulin A response to *Streptococcus mutans* GbpB.** *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14:804-807.

NURKKA, A.; AHMAN, H.; KORKEILA, M.; JANTTI, V.; KAYHTY, H.; ESKOLA, J. **Serum and salivary anti-capsular antibodies in infants and children immunized with the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine.** *Pediatr Infect Dis J.* 2001 Jan; 20(1):25-33.

OFFENBACHER, S.; KATZ, V.; FERTIK, G.; COLLINS, J.; BOYD, D.; MAYNOR, G.; MCKAIG, R.; BECK, J. **Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight.** *J Periodontol.* v.67, n.10 Suppl. 1996; Oct, p.1103-13.

PARK, A.Y.; SCOTT, P. **IL-12: keeping cell-mediated immunity alive.** *Scand J Immunol.* 2001; 53:529-32.

PEARCE, C.; BOWDEN, G.H.; EVANS, M.; FITZSIMMONS, S.P.; JOHNSON, J.; SHERIDAN, M.J.; WIENTZEN, R.; COLE, M.F. **Identification of pioneer *viridans streptococci* in the oral cavity of human neonates.** *J Med Microbiol.* 1995; 42:67-72.

PULVER, L.S.; HOPFENBECK, M.M.; YOUNG, P.C.; STODDARD, G.J.; KORGENSKI, K.; DALY, J.; BYINGTON, C.L. **Continued early onset group B streptococcal infections in the era of intrapartum prophylaxis.** *J. Perinatol.* 2009; 29:20-25.

REDWINE, L.; HAUGER, R.L.; GILLIN, J.C.; IRWIN, M. **Effects of sleep and sleep deprivation on interleukin-6, growth hormone, cortisol, and melatonin levels in humans.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Oct;85(10):3597-603.

ROHAN, L.C.; EDWARDS, R.P.; KELLY, L.A.; COLENELLO, K.A.; BOWMAN, F.P.; CROWLEY-NOWICK, P.A. **Optimization of the weck-Cel collection method for quantitation of cytokines in mucosal secretions.** *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000 Jan; 7(1):45-8.

ROMAGNOLI, C.; FREZZA, S.; CINGOLANI, A.; DE LUCA, A.; PUOPOLO, M. **Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis.** *Eur J Pediatr.* 2001; 160: 345–350. Find this article online.

RUSSELL, M.W.; HAJISHENGALLIS, G.; CHILDERS, N.K.; MICHALEK, S.M. **Secretory immunity in defense against cariogenic *mutans streptococci*.** *Caries Res.* 1999; 33: 4-15.

SADEGHI, K.; BERGER, A.; LANGGARTNER, M.; PRUSA, A.R.; HAYDE, M.; HERKNER, K.; POLLAK, A.; SPITTLER, A.; FORSTER-WALDL, E. **Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling.** *J. Infect. Dis.* 2007; 195:296-302.

SAIGAL, S.; HOULT, L.A.; STREINER, D.L.; STOSKOPF, B.L.; ROSENBOUM, P.L. **School difficulties at adolescence in a regional cohort of children who were extremely low birth weight.** *Pediatrics* 2000; 105: 325- 31.

SAITO, S.M.; SAITO, Y.; KATO, M.; MARUYAMA, I.; MORIYAMA, AND M. ICHIJO. **Production of IL-6 (BSF-2/IFN P2) by mononuclear cells in premature and term infants.** J. Reprod. Immunol. 1990; 17:17-26.

SARROUH, B.F.; RIVALDI, J.D.; GAMBARATO, B.C.; SANTOS, D.T.; SILVA, S.S. **Importância das citoquinas no sistema imunológico: propriedades e características funcionais.** Revista Analytica. 2007; 32:42-48.

SEIDEL, B.M.; SCHULZE, B.; KIESS, W.; VOGTMANN. C.; BORTE, M. **Determination of secretory IgA and albumin in saliva of newborn infants.** Biol Neonate. 2000 Oct;78(3):186-90.

SEOW, W.K. **A study of the development of the permanent dentition in very low birth weight children.** Pediatr Dent. 1996; Sep-Oct;18(5):379-84

SEOW, W.K. **Effects of preterm birth on oral growth and development.** Aust Dent J. 1997; Apr; 42(2):85-91.

SEYMOUR, G.J.; GEMMELL, E. **Cytokines in periodontal disease: where to from here.** Acta Odontol Scand. 2001; 59: 167-173.

SILVA, A.A.; COIMBRA, L.C.; DA SILVA, R.A.; ALVES, M.T.; LAMY FILHO, F.; CARVALHO LAMY, Z.; GOMIDE MOCHEL E.; ARAGAO, V.M.; RIBEIRO, V.S.; TONIAL, S.R.; BARBIERI, M.A. **Perinatal health and mother-child health care in the municipality of São Luís, Maranhão State, Brazil.** Cad Saúde Pública 2001; 17 (6): 1413-23.

SMITH, D.J.; KING, W.F.; TAUBMAN, M.A. **Isotype, subclass and molecular size of immunoglobulins in salivas from young infants.** Clin Exp Immunol. 1989; 76:97-102.

SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A. **Effect of local deposition of antigen on salivary immune responses and reaccumulation of *mutans streptococci*.** J Clin Immunol. 1990; 10:273-281.

SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A. **Ontogeny of immunity to oral microbiota in humans.** Crit Rev Oral Biol Med. 1992; 3:109-133.

SMITH; D.J.; KING, W.F.; AKITA,H.; TAUBMAN, M.A. **Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial *mutans streptococcal* infection.** Oral Microbiol Immunol. 1998; 13:278-285.

SMITH, D.J. **Dental caries vaccines: prospects and concerns.** Crit Rev Oral Biol Med. 2002; 13: 335-49.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; SMITH, C.; DIBART, S. **Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site.** J Clin Periodontol. 1991 Nov;18(10):766-75.

SOCRANSKY, S.S.; SMITH, C.; MARTIN, L.; PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E.; LEVIN, A.E. **'Checkerboard' DNA-DNA hybridization.** Biotechniques. 1994; 17:788-792.

TANNER, A.C.; MILGROM, P.M.; KENT, R.JR; MOKEEM, S.A.; PAGE, R.C.; LIAO, S.I.; RIEDY, C.A.; BRUSS, J.B. **Similarity of the oral microbiota of pre-school children with that of their caregivers in a population-based study.** *Oral Microbiol Immunol.* 2002; 17:379-387.

TANZER, J.M.; LIVINGSTON, J.; THOMPSON, A.M. **The microbiology of primary dental caries in humans.** *J Dent Educ.* 2001; 65:1028-1037.

TAPPUNI, A.R.; CHALLACOMBE, S.J. **Distribution and isolation frequency of eight streptococcal species in saliva from predentate and dentate children and adults.** *J Dent Res.* 1993; 72:31-36.

TELES, R.P.; LIKHARI, V.; SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. **Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study.** *J Periodontal Res.* 2009 Jun;44(3):411-7. Epub 2009 Feb 6.

THRANE, P.S.; ROGNUM, T.O.; HUITFELDT, H.S.; BRANDTZAEG, P. **The distribution of HLA-DR determinants; secretory component (SC), amylase, lysozyme, IgA, IgM and IgD in fetal and postnatal salivary glands.** *AdvExp Med Biol.* 1987; 216:1431-1438.

UENO, Y. N.; TAKANO, H.; KANEGANE, T.; YOKOI, A.; YACHIE, T.; MIYAWAKI, AND N. TANIGUCHI. **The acute phase nature of interleukin 6: studies in Kawasaki disease and other febrile illnesses.** *Clin. Exp. Immunol.* 1989; 76:337-342.

VAN DAMME, J.G.; OPDENAKKER, R. J.; SIMPSON, M. R.; RUBIRA, S.; CAYPHAS, A.; VINK, A.; BILLIAU, AND J. VAN SNICK. **Identification of the human 26-kD protein, interferon P2 (IFNP2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor.** *J. Exp. Med.* 1987; 165:914-919.

VAN NIEUW AMERONGEN, A.; BOLSCHER, J.G.; VEERMAN, E.C. **Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology?** *Caries Res.* 2004 May-Jun;38(3):247-53.

WAN, A.K.; SEOW, W.K.; PURDIE, D.M.; BIRD, P.S.; WALSH, L.J.; TUDEHOPE, D.I. **Immunoglobulins in saliva of preterm and full-term infants. A longitudinal study from 0-18 months of age.** *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18:72-78.

XIMENEZ-FYVIE, L.A.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. **Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis.** *J Clin Periodontol.* 2000 Oct;27(10):722-32.

YACHIE, A. N.; TAKANO, T.; YOKOI, K.; KATO, Y.; KASAHARA, T.; MIYAWAKI, AND N. TANIGUCHI. **The capability of neonatal leukocytes to produce IL-6 on stimulation assessed by whole blood culture.** *Pediatr. Res.* 1990; 27:227-233.

YAMAZAKI, K.; NAKAJIMA, T.; KUBOTA, Y.; GEMMELL, E.; SEYMOUR, G.J.; HARA, K. **Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease.** *Oral Microbiol Immunol.* 1997; 12:281-287.

YOON, B.H.;ROMERO, R.; PARK, J.S.; KIM, M.; OH, S.Y.; KIM, C.J.; JUN, J.K. **The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord**

plasma interleukin-6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis. Am J Obst Gynecol. 2000; 183:1124-9.

ANEXOS

ANEXO 1 (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado as mães antes da coleta de saliva)

Termo de informação e consentimento para a participação em pesquisa clínica

Título: ANÁLISE DOS NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINAS, INTERLEUCINAS E COLONIZAÇÃO BACTERIANA EM AMOSTRAS SALIVARES NOS PRIMEIROS MESES DE VIDA EM NASCIDOS A TERMO E PRÉ-TERMO.

Pesquisadores:

Maria Lúcia Talarico Sesso (Mestranda)

Dra. Ruchele Dias Nogueira (Orientadora)

Endereço: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Departamento de Puericultura e Pediatria

Este termo contém as informações sobre a pesquisa na qual você e seu (ua) filho (a) poderão participar. **Por favor, leia-o atentamente.** Qualquer dúvida que tiver, esclareça-a com a pesquisadora responsável, a qual estará a sua inteira disposição. Você deve decidir se deseja ou não participar desta pesquisa após entender todos os aspectos descritos a seguir, de modo que possa tomar uma decisão consciente.

1) Objetivo:

Esta pesquisa tem como objetivo analisar a cavidade oral de crianças nascidas a termo e prematuras, através da coleta de saliva estimulada, com a qual iremos analisar a colonização bacteriana da mucosa oral dessas crianças. Este estudo pretende identificar possíveis fatores bacterianos e imunológicos relacionados com a capacidade destes microrganismos de se estabelecer na boca, inclusive o *Streptococcus mutans* que é o principal microrganismo envolvido com cárie dentária. E ainda, analisar possíveis deficiências de desenvolvimento de anticorpos na boca de bebês prematuros.

2) Justificativas:

Os anticorpos presentes nas salivas representam uma importante defesa do organismo contra bactérias que adentram a boca. Os bebês, logo após o nascimento, apresentam poucos anticorpos ou mesmo anticorpos despreparados para eliminar estes microrganismos invasores. Crianças nascidas prematuramente parecem apresentar deficiências de anticorpos maiores que bebês nascidos em tempo certo, daí a necessidade de maiores estudos envolvendo estes bebês (prematuros) para que se consiga um perfeito entendimento e possíveis medidas preventivas para controle de infecções.

A cárie dental é uma doença infecciosa, cujo tratamento dos sintomas através de restauração do dente cariado é extremamente caro. A maior parte dos recursos públicos e privados ainda é aplicada em procedimentos curativo-restauradores e pouca ênfase é dada ao avanço de estratégias preventivas de controle desta doença. *Streptococcus mutans* é uma bactéria que adentra a boca e é a principal responsável pelo desenvolvimento da cárie dental. Procura-se também avaliar a capacidade de defesa das crianças logo ao nascimento e aos 3 meses de vida contra estas bactérias durante os processos de infecção. Assim, teremos maiores dados para o desenvolvimento de estratégias de controle de infecção que possam ser aplicados em programas de saúde pública.

3) Descrição da pesquisa:

Participarão deste trabalho 200 crianças com idade inicial de 0 dias, as quais serão acompanhadas até atingirem 3 meses de idade. A criança será submetida à coleta de saliva com uma pipeta plástica descartável e esterilizada. Este material será utilizado nesta pesquisa ou em pesquisas futuras relacionadas. As mães das crianças participantes também serão entrevistadas para a obtenção de informações adicionais sobre seus (uas) filhos (as).

4) Desconfortos, riscos e benefícios esperados:

As crianças que participarem da pesquisa serão examinadas e terão as salivas não estimuladas, coletadas com pipetas que serão introduzidas na região da boca, sugando uma pequena quantidade de saliva, procedimento este que causa mínimo desconforto. Não existem riscos adicionais. As mães serão entrevistadas pela pesquisadora responsável nas maternidades em que o parto foi realizado. Os benefícios serão os conhecimentos gerados por esta pesquisa e o diagnóstico precoce de possíveis problemas bucais e de saúde geral, o qual será transmitido às mães e agentes de saúde.

5) Alternativas:

Não existem métodos alternativos para a obtenção das informações necessárias.

6) Exclusões:

Serão excluídas das pesquisas, as crianças com problemas de saúde geral ou sob antibiótico terapia até três semanas antes do dia do exame.

7) Compensação:

Não há previsão de indenização ou ressarcimento, pois não existirão gastos ou riscos relacionados exclusivamente com a pesquisa.

8) Confidencialidade dos registros:

Você e seu filho terão direito à privacidade, visto que todas as informações obtidas dos prontuários clínicos e laboratoriais permanecerão confidenciais nos âmbitos possíveis da lei, assegurando a proteção da sua imagem. Serão respeitados seus valores culturais, sociais, morais, religiosos e éticos. A menos que a revelação seja exigida por ação legal ou regulatória, todos os esforços serão feitos para protegê-los, a você e a seu (ua) filho (a), de serem identificados pessoalmente. Como participante desta pesquisa, você terá acesso aos resultados obtidos e permitirá o acesso dos mesmos aos pesquisadores envolvidos e aos membros da comissão de ética responsável. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em congressos ou publicados em revistas científicas, porém sua identidade não será divulgada.

9) Direito de participar, recusar ou sair:

Sua participação é voluntária e você poderá recusar-se a participar ou mesmo interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perdas de seus benefícios aos quais de outra forma tenha direito. Os pesquisadores terão o direito de desligá-lo do estudo a qualquer momento, se julgarem necessário. Ao participar, você concorda em cooperar com a pesquisa, não abrindo mão de seus direitos legais ao assinar o termo de consentimento informado.

10) Contatos:

Quaisquer dúvidas poderão ser esclarecidas com o pesquisador responsável, Dra. Ruchele Dias Nogueira e Mestranda Maria Lúcia Talarico Sesso, no laboratório do Departamento de Puericultura e Pediatria, bloco G, 1º andar, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Tendo compreendido o termo de informação e consentimento para a participação da pesquisa clínica intitulada **“ANÁLISE DOS NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINAS, INTERLEUCINAS E COLONIZAÇÃO BACTERIANA EM AMOSTRAS SALIVARES NOS PRIMEIROS MESES DE VIDA EM NASCIDOS A TERMO E PRÉ-TERMOS”**, autorizo a participação de meu (minha) filho (a), _____, bem como concordo em participar deste estudo. Sei que nossa participação é voluntária e que posso interrompê-la a qualquer momento sem penalidades. Autorizo a utilização dos dados obtidos pelos pesquisadores envolvidos para a publicação em revistas científicas e apresentação em congressos.

Recebi uma cópia do termo de consentimento.

(Não assine este termo caso não tenha tido oportunidade de esclarecer suas dúvidas ou não tenha recebido respostas satisfatórias a todas elas).

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Nome da mãe: _____

RG: _____

Assinatura: _____

Maria Lúcia Talarico Sesso

Mestranda

Dra. Ruchele Dias Nogueira

Orientadora

ANEXO 2 A (Questionário aplicado durante a coleta de saliva ao nascimento – T0)

QUESTIONÁRIO 1Prematuro: Não ☐ Sim ☐

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

DADOS MATERNAIS

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. () cesárea 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. Frequentemente 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: _____

Data nasc.: ____/____/____ Sexo: () F () M

Peso: _____ Kg Comprimento: _____ 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

Retorno: ____/____/____

ANEXO2B (Questionário aplicado durante a coleta de saliva 2ª visita – T3)

QUESTIONÁRIO 2 - DADOS DA CRIANÇA APÓS 3 MESES

meses: _____ **Data da visita:** ____/____/____

1. Amamenta seu filho(a) no momento? 1.(☐) Sim 2.(☐) Não
Se não, pq ou quando parou? _____
2. Quantas vezes por dia seu filho(a) é (foi) amamentado? _____
3. Durante a noite, você amamenta ou amamentava seu(ua) filho(a)
1.(☐) nunca 2.(☐) antes da hora de dormir 3. (☐) várias vezes.
Quantas vezes?
4. Seu(ua) filho(a) toma mamadeira durante o dia? 1.(☐) Sim 2. (☐) Não
Se sim, quantas? _____
5. Qual a receita da mamadeira que seu(ua) filho(a) toma durante o dia ? _____
6. Seu(ua) filho(a) toma mamadeira à noite ? 1. (☐) Sim 2. (☐) Não
7. Qual a receita da mamadeira que você oferece ao seu(ua) filho (a) à noite?

8. Seu(ua) filho(a) tem ou teve nos últimos 3 meses algum problema de saúde?
1. (☐) Sim 2.(☐) Não
Se sim, qual? _____
10. Seu(ua) filho(a) está com alguns dos seguintes problemas saúde?
1.(☐) asma 2. (☐) outros problemas respiratórios. Quais? _____
3.(☐) pneumonia 4.(☐) inflamação / dor de garganta (faringite)
5.(☐) inflamação no ouvido (otite) 6.(☐) desnutrição
7.(☐) doenças de infância (sarampo, catapora, rubéola). Qual? _____
11. Seu filho(a) está tomando algum antibiótico? Qual? Há quanto tempo? Quantas vezes por dia?

12. Qual a frequência de alguns desses sintomas para o seu(ua) filho(a)?
- Nariz escorrendo: (☐) nunca (☐) algumas vezes (☐) muito freqüente (☐) todo tempo
- Tosse: (☐) nunca (☐) algumas vezes (☐) muito freqüente (☐) todo tempo
- Nariz entupido/ respira pela boca (☐) nunca (☐) algumas vezes (☐) muito freqüente (☐) todo tempo
- Garganta inflamada: (☐) nunca (☐) algumas vezes (☐) muito freqüente (☐) todo tempo
14. Seu(ua) filho(a) usa chupeta?
1. (☐) não 2. (☐) a toda hora 3. (☐) às vezes _____ 4. (☐) só para dormir

ANEXO 3 (Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP/USP)

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

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 29 de agosto de 2007

Ofício nº 2963/2007
CEP/SPC

Prezada Senhora,

O trabalho intitulado **“RESPOSTA IMUNE DE MUCOSAS EM NASCIDOS PRÉ-TERMO (PT) E DE BAIXO PESO AO NASCER (BPN)”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 253ª Reunião Ordinária realizada em 27/08/2007, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 4105/2007.

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

Atenciosamente.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
RUCHELE DIAS NOGUEIRA
PROFª DRª VIRGÍNIA PAES LEME FERRIANI (Orientadora)
Depto. de Puericultura e Pediatria

Comitê de Ética em Pesquisa HC e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO 4 (Artigo publicado em revista científica no ano de 2012)

A0B 2718 1-7

ARTICLE IN PRESS

ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY XXX (2011) XXX-XXX

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/aob>

Salivary IgA antibody responses to *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* in preterm and fullterm newborn children

Ruchele Dias Nogueira^{a,b,*}, Maria Lucia Talarico Sesso^b, Mariana Castro Loureiro Borges^b, Renata O. Mattos-Graner^c, Daniel James Smith^d, Virginia Paes Leme Ferriani^b

^a University of Uberaba, Minas Gerais, Brazil

^b Department of Pediatrics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Department of Microbiology and Immunology, Piracicaba School of Dentistry, University of Campinas, São Paulo, Brazil

^d Department of Immunology, The Forsyth Institute, MA, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 7 November 2011

Keywords:

Streptococcus mutans

Streptococcus mitis

IgA

Saliva

Prematurity

ABSTRACT

Objectives: The intensities and specificities of salivary IgA antibody responses to antigens of *Streptococcus mutans*, the main pathogen of dental caries, may influence colonization by these organisms during the first 1.5 year of life. Thus, the ontogeny of salivary IgA responses to oral colonizers continues to warrant investigation, especially with regard to the influence of birth conditions, e.g. prematurity, on the ability of children to efficiently respond to oral microorganisms. In this study, we characterized the salivary antibody responses to two bacterial species which are prototypes of pioneer and pathogenic microorganisms of the oral cavity (*Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans*, respectively) in fullterm (FT) and preterm (PT) newborn children.

Methods: Salivas from 123 infants (70 FT and 53 PT) were collected during the first 10 h after birth and levels of IgA and IgM antibodies and the presence of *S. mutans* and *S. mitis* were analysed respectively by ELISA and by checkerboard DNA-DNA hybridization. Two subgroups of 24 FT and 24 PT children were compared with respect to patterns of antibody specificities against *S. mutans* and *S. mitis* antigens, using Western blot assays. Cross-adsorption of 10 infant's saliva was tested to *S. mitis*, *S. mutans* and *Enterococcus faecalis* antigens.

Results: Salivary levels of IgA at birth were 2.5-fold higher in FT than in PT children (Mann-Whitney; $P < 0.05$). Salivary IgA antibodies reactive with several antigens of *S. mitis* and *S. mutans* were detected at birth in children with undetectable levels of those bacteria. Adsorption of infant saliva with cells of *S. mutans* produced a reduction of antibodies recognizing *S. mitis* antigens in half of the neonates. The diversity and intensity of IgA responses were lower in PT compared to FT children, although those differences were not significant.

Conclusion: These data provide evidence that children have salivary IgA antibodies shortly after birth, which might influence the establishment of the oral microbiota, and that the levels of salivary antibody might be related to prematurity.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Puericultura e Pediatria, Av. dos Bandeirantes, 3900, CEP 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel.: +55 16 3602 2902; fax: +55 16 3602 2297.

E-mail address: ruchelednogueira@yahoo.com.br (R.D. Nogueira).

0003-9969/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.archoralbio.2011.11.011

1. Introduction

The mucosal immune system represents the first line of defence in the adaptive immune response to mucosal infection. Secretory IgA (SIgA) present in saliva¹ may control the oral microbiota by reducing the adherence of bacteria to the oral mucosa and teeth.² The total levels of SIgA in saliva have been considered as an indicator of maturation of the mucosal immune system in children.³⁻⁶ Transient reductions in the levels of IgA detected in saliva were associated with increased susceptibility to infections of the gastrointestinal tract.^{4,6} Several factors might influence the development of an effective mucosal immune response, including nutritional status, breastfeeding, gestational age, exposure to antigens and genetic factors.⁷ Newborn infants are known to have a higher frequency of microbial infections than older children and adults soon after birth, due to immaturity of the immune system.⁸ Babies born prematurely (less than 37 weeks gestation) have 5 times higher susceptibility to bacterial infections.⁹ Streptococci such as *S. mitis* represent the majority of bacteria that initially colonize the oral cavity.¹⁰⁻¹² After tooth eruption new species colonize such as *S. mutans*,^{5,13} although such species can be also detected in children before tooth eruption.¹⁴ Prospective study of 5- to 24-month-old children heavily exposed to *S. mutans* showed a complex pattern of salivary IgA antibody reactivity to antigens from *S. mutans* and *S. mitis*,^{15,16} suggesting that responses to virulence-associated antigens early in life may influence the ability of *S. mutans* to colonize the oral cavity. Several recent studies showed that SIgA is present in saliva and other secretions at birth.^{6,7} However, the influence of these antibodies in the establishment of the oral microbiota is unknown.

In this study, we characterised the levels and specificities of salivary IgA antibodies to *S. mitis* and *S. mutans* antigens in newborn children, and compared intensities and complexities of antibody responses between fullterm (FT) and preterm (PT) children.

2. Materials and methods

2.1. Study design

A total of 123 (70 FT and 53 PT) newborn children in the Hospital of the University of Ribeirão Preto, Brazil were enrolled in this study, under mothers consent for their participation. This study was approved by the Ethical Committee of the Medical School of Ribeirão Preto, SP, Brazil, 2963/2007. To be included in the study population, only healthy newborns less than 10 h old were included in this study. Children with congenital malformations, perinatal hypoxia, intracranial haemorrhage, with length or weight incompatible with gestational ages, or under antibiotic therapy were excluded from this study. Gestational age was estimated from the reported date of last menstruation period and somatic evaluation. Information on maternal and gestational background was obtained by interviewing the mother. A total of 123 children, 70 FT and 53 PT were born at mean gestational ages of 39.2 (SD: 1.23, range: 37-41) and 34.5

(SD: 2.21, range: 30-36.5) weeks respectively. Forty-one (18 PT and 23 FT) and 82 (35 PT and 47 FT) infants were delivered by caesarean and vaginally section respectively. Amongst those children ($n = 123$) from whom volumes of saliva collected were suitable for laboratory analysis, two subsets of children were selected for immunological analysis: 24 PT (<37 weeks of gestation) and 24 FT children. For the purposes of comparison, these PT and FT children were paired based on total salivary levels of IgA, gender, racial background and breastfeeding.

2.2. Collection of samples

Samples of whole saliva unstimulated were collected using sterile polypropylene transfer pipettes. Collections were performed in all children at approximately 4-10 h after birth in order to standardize the collection and the oral microbial exposure, and at least 3 h after breastfeeding to avoid contamination with non-salivary components, but in four children (3 FT and 1 PT) saliva samples were collected before the first breastfeeding. Solution of 250 mM EDTA, pH 5.2 (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added to each sample prior to transport on ice to the laboratory where they were stored at -80°C until analysis. Samples of colostrum and maternal milk were collected by manual expression into empty sterile containers on the 1st day of lactation from 20 puerperal mothers of the same children in the study. After collection, the maternal samples also were transported on ice to the laboratory, centrifuged to remove lipids components and stored at -80°C until use.

2.3. Detection of Streptococcal species in the oral cavity

The presence of *S. mutans* and *S. mitis* in the samples of saliva of newborn children was investigated by chequerboard DNA-DNA hybridization with species-specific probes as described by Socarransky et al.¹⁷ Briefly, 0.5 M NaOH, pH 13.4 (Sigma) was added to saliva samples. After boiling, samples were applied and fixed by exposure to ultra-violet light (Hybrilinker, UVP, Upland, CA, USA) in individual lanes on a nylon membrane (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) using the chequerboard slot blot device (Minislot 30, Immunetics, Cambridge, MA, USA). Digoxigenin-labelled whole genomic DNA probes were prepared for each one of the reference strains (*S. mutans* [UA159] and *S. mitis* [ATCC5061]) using a random primer technique. These two DNA probes were hybridized perpendicularly to the lanes of the bacterial samples using the Miniblotter 45 (Immunetics Cambridge, MA, USA) at 70°C . Bound probes were detected using phosphatase-conjugated antibody to digoxigenin (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and revealed with CDP-Star[®] (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). Two lanes in each run contained standards at concentrations of 10^5 and 10^6 cells of each species. The sensitivity of the assay was adjusted to permit detection of 10^4 cells of a given species by adjusting the concentration of each DNA probe. The signals developed on X-ray films were scanned in a densitometer (Bio-Rad GS-700 Imaging Densitometer, Hercules, CA, USA) and evaluated using the ImageQuant Software (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). Signals were converted to absolute counts by comparison

with the standards on the same membrane. Failure to detect a signal was recorded as zero.

2.4. Concentration of protein, IgA and IgM

Total concentration of protein in saliva was determined by the method of Bradford (Sigma) to check for variations in salivary flow. Total levels of IgA and IgM were determined in capture ELISA assays as previously described.¹⁵

2.5. Salivary and maternal milk IgA reactivity against bacterial antigens

Patterns of reactivity of salivary IgA and breast milk antibody against *S. mitis* (ATCC 906) and *S. mutans* (UA 159) Ags were determined in Western blot assays. Sixteen micrograms of antigen extracts prepared as previously described¹⁵ were loaded per lane, separated by sodium dodecyl sulphate-6% polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to nitrocellulose membranes. After being stained with Red Ponceau (Sigma), membranes were washed and blocked overnight at 4 °C (in Tris-buffered saline-Tween, pH 7.5, 5% nonfat milk). Incubations with samples diluted 1:100 were performed at room temperature for 2 h. As negative controls, membranes were incubated only with blocking buffer, and as positive controls, membranes were incubated with a standard saliva sample obtained from an adult whose pattern of reaction with *S. mutans* and *S. mitis* antigen extracts had been previously measured. The secondary antibody was goat IgG anti-human IgA conjugated with horseradish peroxidase (1:4000 dilution). Antibody reactions were developed using an ECL system (Amersham Biosciences). For this purpose, immunoblots were incubated with ECL detection solution and then exposed to the

same X-ray film for 5 min. The developed X-ray films were scanned in a scanning densitometer (Bio-Rad GS-700 Imaging Densitometer) to analyse patterns of antigen recognition, including the number and intensity of reactive bands. A film blank value was subtracted from the value of the reactive band.

In order to determine whether any of the antibodies detected were uniquely specific for a single species, ten saliva samples (3 PT and 7 FT) were adsorbed sequentially with antigens of cells of *S. mitis*, *S. mutans* and *Enterococcus faecalis* as described by Cole et al.¹⁸ Antibody activities remaining after adsorption (percent) were determined by dividing the optical density at 450 nm of each adsorbed saliva by that of the corresponding unadsorbed saliva at the same dilution and multiplying by 100.

2.6. Statistical analysis

Associations between concentrations of IgA, IgM and total protein, and patterns of antibody reactions were tested by Spearman correlation analysis. Differences in the densitometry values of reactive Ags between the subsets of PT and FT children were analysed by a Mann-Whitney U test. Comparisons of the frequencies of children with distinct IgA antibody specificities were tested by a chi-square test. A P-value of < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Levels of IgA and IgM

Immunoglobulin A and IgM were detected in all saliva samples tested (n = 123). There were statistically significant differences

Fig. 1 – Levels of salivary IgA (A) and IgM (B) observed amongst 123 children, Preterm (PT) and Fullterm (FT) measured in the same samples. Squares represent absolute amounts of immunoglobulins in salivas (µg/ml). Asterisks represent the median levels of Ig in each group of children.

with the standards on the same membrane. Failure to detect a signal was recorded as zero.

2.4. Concentration of protein, IgA and IgM

Total concentration of protein in saliva was determined by the method of Bradford (Sigma) to check for variations in salivary flow. Total levels of IgA and IgM were determined in capture ELISA assays as previously described.¹⁵

2.5. Salivary and maternal milk IgA reactivity against bacterial antigens

Patterns of reactivity of salivary IgA and breast milk antibody against *S. mitis* (ATCC 906) and *S. mutans* (UA 159) Ags were determined in Western blot assays. Sixteen micrograms of antigen extracts prepared as previously described¹⁵ were loaded per lane, separated by sodium dodecyl sulphate-6% polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to nitrocellulose membranes. After being stained with Red Ponceau (Sigma), membranes were washed and blocked overnight at 4 °C (in Tris-buffered saline-Tween, pH 7.5, 5% nonfat milk). Incubations with samples diluted 1:100 were performed at room temperature for 2 h. As negative controls, membranes were incubated only with blocking buffer, and as positive controls, membranes were incubated with a standard saliva sample obtained from an adult whose pattern of reaction with *S. mutans* and *S. mitis* antigen extracts had been previously measured. The secondary antibody was goat IgG anti-human IgA conjugated with horseradish peroxidase (1:4000 dilution). Antibody reactions were developed using an ECL system (Amersham Biosciences). For this purpose, immunoblots were incubated with ECL detection solution and then exposed to the

same X-ray film for 5 min. The developed X-ray films were scanned in a scanning densitometer (Bio-Rad GS-700 Imaging Densitometer) to analyse patterns of antigen recognition, including the number and intensity of reactive bands. A film blank value was subtracted from the value of the reactive band.

In order to determine whether any of the antibodies detected were uniquely specific for a single species, ten saliva samples (3 PT and 7 FT) were adsorbed sequentially with antigens of cells of *S. mitis*, *S. mutans* and *Enterococcus faecalis* as described by Cole et al.¹⁸ Antibody activities remaining after adsorption (percent) were determined by dividing the optical density at 450 nm of each adsorbed saliva by that of the corresponding unadsorbed saliva at the same dilution and multiplying by 100.

2.6. Statistical analysis

Associations between concentrations of IgA, IgM and total protein, and patterns of antibody reactions were tested by Spearman correlation analysis. Differences in the densitometry values of reactive Ags between the subsets of PT and FT children were analysed by a Mann-Whitney U test. Comparisons of the frequencies of children with distinct IgA antibody specificities were tested by a chi-square test. A P-value of < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Levels of IgA and IgM

Immunoglobulin A and IgM were detected in all saliva samples tested (n = 123). There were statistically significant differences

Fig. 1 – Levels of salivary IgA (A) and IgM (B) observed amongst 123 children, Preterm (PT) and Fullterm (FT) measured in the same samples. Squares represent absolute amounts of immunoglobulins in salivas (µg/ml). Asterisks represent the median levels of Ig in each group of children.

in levels of salivary IgA between PT (median: 0.78, interquartile range [IQR]: 0.43–1.49) and FT (median: 1.09, IQR: 0.55–2.75) (Mann–Whitney *U* test, $P < 0.05$). A positive correlation was observed between salivary levels of IgA and IgM in each group (Spearman's, $r > 0.75$, $P < 0.01$). Fluctuation of absolute levels of IgA (A) and IgM (B) are shown in Fig. 1. The median concentration of total protein in saliva was 834.3 $\mu\text{g/ml}$ (IQR: 613.9–1219.4), with similar levels in PT and FT infants (Mann–Whitney, $P > 0.05$). The median ratios of values of IgA normalized by protein concentration (median ratio, 0.10, IQR: 0.05–0.20) determined for PT was significantly lower than that observed in FT infants (median ratio, 0.22, IQR: 0.06–0.40; Mann–Whitney, $P < 0.05$). No significant differences were detected in median ratios of values of IgM normalized by protein concentration between groups (FT = median ratio, 0.08, IQR: 0.02–0.15 vs PT = median ratio, 0.10, IQR: 0.02–0.20, Mann–Whitney, $P > 0.05$). The median concentration of total IgA in maternal milk was 2567.8 $\mu\text{g/ml}$ (IQR: 834.0–3986.3) not differing between mothers of preterm and full-term infants (Mann–Whitney, $P > 0.05$). Also, the levels of immunoglobulins and proteins were similar in infants delivered by caesarean section or vaginally (Mann–Whitney, $P > 0.05$).

3.2. Complexity and intensity of IgA response to *S. mutans* and *S. mitis* Ags

Detection of streptococci in oral samples using chequerboard DNA–DNA hybridization assays showed that no children have *S. mitis* or *S. mutans* in saliva samples at the levels tested. Fifty and 37.5% of PT ($n = 12$) and FT ($n = 9$) respectively did not show IgA-reactive bands to the antigen extracts tested. However, amongst the IgA-reactive children, several bands of IgA reactivity with *S. mutans* and *S. mitis* antigens were identified, especially in FT children. Examples of immunoblots incubated with salivas from three representative pairs of PT and FT children against Ags from *S. mutans* and *S. mitis* are shown in Fig. 2A. Maternal and child patterns of IgA-reactivity with *S. mitis* and *S. mutans* antigens were compared. Interestingly, few coincident bands were noted between mother and child. Median percentage values of coincident bands to total number of bands identified were 5 and 8% for *S. mitis* and *S. mutans*, respectively. Three pairs of examples of immunoblots comparing the mother milk and her baby's saliva are shown in Fig. 2B. In addition, the immunoblots from two children (1 PT and 1 FT) who were not yet breast fed presented IgA response to antigens from *S. mutans* and *S. mitis* (Fig. 2A, pair 10).

Fig. 2 – (A–B) Patterns of IgA specificities against antigens from *S. mitis* (SMI) and *S. mutans* (SM) in 3 pairs (A) of preterm (PT) and fullterm (FT) children's salivas. Standard molecular sizes (kDa) and specific antigens (202, 185 and 160 kDa) are indicated on the left side of the immunoblots. (B) Comparison of complexity of IgA antibody reactivities between 2 samples of milk's mother and their respective baby's salivas.

Table 1 – Comparisons of the frequencies of children with positive salivary IgA responses and sum of mean intensities to total and specific Ags from *Streptococcus mitis* (SMI) and *Streptococcus mutans* (SM) between preterm (PT) and fullterm (FT) groups.

Antigens	Number (%) of children with salivary IgA reactive		Sum of mean intensity of salivary IgA reactive $\pm$ SD	
	PT n = 24	FT n = 24	PT n = 24	FT n = 24
<i>Streptococcus mitis</i>				
Total SMI Ags	11(46)	12(50)	296 $\pm$ 575	10201 $\pm$ 29482
202 kDa Ags (IgA1-protease)	3(13)	7(29)	85 $\pm$ 244	107 $\pm$ 226
Mean number of reactive Ags $\pm$ SD	1.0 $\pm$ 1.5*	2.7 $\pm$ 4.1*		
<i>Streptococcus mutans</i>				
Total SM Ags	7(29)	11(46)	215 $\pm$ 567	466 $\pm$ 896
160 kDa Ags (GTF C)	2(8)	6(25)	16 $\pm$ 53	47 $\pm$ 125
185 kDa Ags (Ag I/II)	4(17)	4(17)	21 $\pm$ 88	46 $\pm$ 104
Mean number of reactive Ags $\pm$ SD	0.9 $\pm$ 1.6	1.5 $\pm$ 2.0		

* Significant differences between PT and FT groups; Mann-Whitney U test: $P \leq 0.05$.

Antigens in both species are shown to react with salivary IgA in both pairs. Taken together, these data suggest that the IgA reactivities seen in the children's salivas are derived, at least in part, from the child.

The numbers of children that presented detectable IgA antibodies to antigens of each *Streptococcal* species and mean numbers of reactive bands detected are shown in Table 1. Although IgA antibody responses were detected more frequently to *S. mitis* Ags ($n = 23$, [11 PT and 12 FT]) when compared to *S. mutans* antigens ($n = 18$, [7 PT and 11 FT]) those differences were not significant (Mann-Whitney, $P > 0.05$). Additionally, the number of IgA-reactive bands to *S. mitis* antigens was significantly higher in FT than in PT children (Mann-Whitney U test, $P \leq 0.05$). Six percent of the SDS-PAGE gels analysed allowed the visualization of important antigens from *S. mutans*: Ag I/II (185 kDa), GTF C (160 kDa) and GbpB (56 kDa) and of *S. mitis*: IgA-protease (202 kDa). Twenty-one percent of children ($n = 10$, [3PT and 7FT]) had IgA reactive to Ag 202 kDa-*S. mitis* and 16.5 ($n = 8$, [2PT and 6FT]) and 17 ($n = 8$ [4FT and 4 PT]) % of children presented IgA reactive to 185 and 160 kDa-*S. mutans* Ags respectively (Table 1). We did not find children with IgA reactive with bands in the 56 kDa region of *S. mutans* blots. There were no significant differences in the number of PT and FT children with IgA responses to these antigens (Qui Square test, $q < 2.01$; $P > 0.27$).

There were variations in the intensities and numbers of IgA antibody reactions with the recognized bands amongst children in both groups. Table 1 shows the sums of intensities of IgA reactions with all bands detected for each species (total intensities) observed in children of the FT and PT groups. In general, FT children presented the highest intensity of IgA to all antigens tested but those differences were not statistically significant (Mann-Whitney U test, $P > 0.2$), likely due to the high variability in intensities of response amongst children of each group.

The results showed that SIgA antibody from 10 samples (3 PT and 7 FT) tested did not react with *E. faecalis* antigens, as SIgA responses to *S. mutans* and *S. mitis* were not reduced by *E. faecalis* cross-adsorption. On the other hand, when samples ($n = 10$) were adsorbed with cells of *S. mitis*, there were mean reductions of 22% of SIgA to *S. mutans* in 5 children (4 FT and 1

PT). In the same children ($n = 5$), there was also a mean reduction of 45% of SIgA to *S. mitis* when samples were adsorbed previously with cells of *S. mutans*.

4. Discussion

Salivary IgA antibodies play several roles in the modulation of the establishment of the microbiota compatible with health homeostasis¹⁹ and form a first line of defence against specific pathogens.¹⁹ Salivary IgA antibodies neutralize antigenic components involved in microbial virulence and might block surface adhesins important for colonization of the mucosa.²⁰ In the saliva, secretory IgA predominates, but early in life, IgM is also normally detected.⁶ Previously, it was described that IgA can be detected in saliva at birth.^{6,7} Here we show that detectable levels of salivary IgA antibodies reactive with common bacterial species of the oral cavity can be detected in the first hours of life.

With respect to gestational age, not only were the total levels of salivary IgA higher in FT (up to 2.5-fold) but also the complexity of IgA against bacterial species (Fig. 2A, Table 1), suggesting that prematurity can lead to a delay in IgA responses at initial stages of antigenic challenge. Longitudinal comparisons of levels of IgA in PT and FT infants could be helpful to clarify the extent to which this difference is maintained over time.

Previously, we suggested that patterns of specificity of IgA antibody responses to *S. mutans* antigens might be more important than total levels of reactive IgA antibodies.¹⁵ In this study, we observed that patterns of protein bands reactive with salivary IgA were variable amongst newborn (Fig. 2A). We reasoned that mucosal responses, most frequently detected in newborns to antigens of *S. mitis*, a pioneer colonizer of oral mucosa, might develop earlier than to *S. mutans*, which colonize children at a later age.^{5,13,14} By separating proteins in 6% SDS-PAGE gels it is possible to visualize the three main cell-associated antigens of *S. mutans*, Ag I/II,²¹ GTF C²² and GbpB⁵ with molecular masses of 185, 160 and 56 kDa respectively. These antigens are involved in the capacity of *S. mutans* to adhere and accumulate in the dental biofilm. A previous study

showed that some five-month-old children presented with salivary IgA reactive to all this antigens, especially to GbpB and may have a role in modulating the level of colonization by *S. mutans*.¹⁵ In the present study, approximately 30% of the children evaluated ($n = 16/48$) presented IgA against AgI/II and GTTC, but not against GbpB (Table 1). Also, 20% of saliva samples from newborn children were reactive with a *S. mitis* 202 kDa component (Table 1), suggesting the presence of IgA reactive to IgA1-protease, an antigen important for *S. mitis* establishment in the oral cavity.^{23,24}

In the present study we analysed the specificity of salivary SIgA antibodies reactive with *S. mutans*, *S. mitis* and *E. faecalis*, to test whether SIgA antibodies reactive with commensal oral bacteria were induced by these bacteria and were, therefore, specific to them or whether they were induced by cross-reactions with other bacteria. The results of cross-adsorption showed that in half of the saliva tested ($n = 5$ of 10), there was a reduction of the salivary IgA to *S. mutans* when the plate was previously absorbed with *S. mitis* antigens. A similar result of levels of salivary IgA to *S. mitis* occurred when the plate was covered with *S. mutans*. The elimination of salivary IgA antibodies reactive with the test species following sequential adsorption of saliva samples with each streptococcal species supports partially the conclusion that the antibodies were cross-reactive rather than species specific, as described previously.^{18,25}

Although in our previous study we detected SIgA antibodies reactive with *S. mutans* in saliva of preterm infants who did not harbour *S. mutans*,¹⁵ here, the presence of specific antibody at birth is unlikely to have been induced within 10 h, since it takes at least a week for the uptake, processing of antigen, B cell selection and migration to local sites, differentiation into plasma cells leading to antibody secretion and endosomal transfer into the gland lumen. Thus, some hypotheses can be raised to address this early response of SIgA to *S. mutans* and *S. mitis* antigens. Firstly, the presence of residual of IgA from maternal milk in the oral cavity of children cannot be excluded, even though the samples have been collected at least 3 h after breastfeeding. For this reason, we compared immunoblotting of infant saliva samples with their respective maternal milk samples (Fig. 2B). The majority of antigens that were more frequently reactive in the infant saliva samples were not recognized by maternal milk (Fig. 2B). Additionally, immunoblots from children who did not receive maternal milk (Fig. 1A, pair 10) presented with IgA antibody reactivity with *S. mutans* and *S. mitis* antigens. The persistence of secretory antibodies in the oral cavity (e.g., following breast feeding) strongly depend on their adhesion to salivary pellicle on tooth surfaces.²⁶ Since newborns are edentulous, this condition for persistence of maternal IgA is absent.

An alternative hypothesis could be associated with the plurispecific protection at mucosal surfaces, proposed by Quan and coworkers,²⁷ who found that SIgA antibodies from human saliva reacted with actin, myosin and tubulin but also with antigens from *Streptococcus pyogenes*. Also, those antibodies could result from stimulation without antigenic exposure, as the result of anti-idiotypic induction²⁸ or intra-uterine stimulation. Thus, several bacteria have been isolated from umbilical cord blood, amniotic fluid and foetal membranes without clinical or histological evidence of infection or inflammation in pairs of mothers and children.²⁹

In summary, the results show that detectable levels of salivary IgA antibodies reactive to oral bacterial species can be detected within the first hours after birth. Furthermore, the salivary IgA concentrations and IgA antibody specificities appear to be influenced by the gestational age, which might reflect the level of immunological maturity of the mucosal immune system. These findings support further study about the investigation of antibody and microbial sources from mother in order to clarify the role and development of mucosal immune response in neonates.

Acknowledgments

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), proc. 07/57346-5, and proc. 07/50807-7 and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), proc. 472928/2007-4.

Ethical approval: This study was approved by the Ethical Committee of the Medical School of Ribeirão Preto, SP, Brazil, reference number: 2963/2007.

REFERENCES

- Russell MW, Hajishengallis G, Childers NK, Michalek SM. Secretory immunity in defense against cariogenic mutans streptococci. *Caries Res* 1999;33(1):4-15.
- Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62(1):71-109.
- Brandtzaeg P, Farstad IN, Haraldsen G, Jahnson FL. Cellular and molecular mechanisms for induction of mucosal immunity. *Dev Biol Stand* 1998;92:93-108.
- Gleeson M, Cripps AW, Clancy RL. Modifiers of the human mucosal immune system. *Immun Cell Biol* 1995;73(5):397-404.
- Smith DJ, King WF, Akita H, Taubman MA. Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial mutans streptococcal infection. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13(5):278-85.
- Wan AK, Seow WK, Purdie DM, Bird PS, Walsh LJ, Tudehope DI. Immunoglobulins in saliva of preterm and full-term infants. A longitudinal study from 0-18 months of age. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18(2):72-8.
- Maruyama K, Hida M, Kohgo T, Fukunaga Y. Changes in salivary and fecal secretory IgA in infants under different feeding regimens. *Pediatr Int* 2009;51(3):342-5.
- Clapp DW. Developmental regulation of the immune system. *Semin Perinatol* 2006;30(2):69-72.
- Kilgman RM, Rottman CJ, Behrman RE. Strategies for the prevention of low birth weight. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162(4):1073-83.
- Pearce C, Bowden GH, Evans M, Fitzsimmons SP, Johnson J, Sheridan MJ, et al. Identification of pioneer viridans streptococci in the oral cavity of human neonates. *J Med Microbiol* 1995;42(1):67-72.
- Hohwy J, Reinholdt J, Kilian M. Population dynamics of *Streptococcus mitis* in its natural habitat. *Infect Immun* 2001;69(10):6055-63.
- Seow WK, Lam JH, Tsang AK, Holcombe T, Bird PS. Oral *Streptococcus* species in pre-term and full-term children - a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent* 2009;19(6):406-11.

13. Causfield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 1993;72(1):37-45.
14. Alves AC, Nogueira RD, Stipp RN, Pampolini F, Moraes AB, Gonçalves RB, et al. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. *J Med Microbiol* 2009;58(4):476-8.
15. Nogueira RD, Alves AC, Napimoga MH, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. *Infect Immun* 2005;73(9):5675-84.
16. Nogueira RD, Alves AC, King WF, Gonçalves RB, Höfling JF, Smith DJ, et al. Age-specific salivary immunoglobulin A response to *Streptococcus mutans* GbpB. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14(6):804-7.
17. Socarransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994;17(4):788-92.
18. Cole, et al. Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants: salivary secretory immunoglobulin A antibodies reactive with *Streptococcus mitis* biovar 1, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, and *Enterococcus faecalis* during the first two years of life. *Infect Immun* 1999;67:1878-86.
19. Peterson DA, McNulty NP, Guruge JL, Gordon JL. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe* 2007;15(2):328-39.
20. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol* 2009;70(6):505-15.
21. Demuth DR, Davis CA, Corner AM, Lamont RJ, Leboy PS, Malamud D. Cloning and expression of a *Streptococcus sanguis* surface antigen that interacts with a human salivary agglutinin. *Infect Immun* 1988;56(9):2484-90.
22. Hanada N, Kuramitsu HK. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* gtfC gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. *Infect Immun* 1988;56(8):1999-2005.
23. Poulsen K, Reinholdt J, Jespersgaard C, Boye K, Brown TA, Hauge M, et al. Comprehensive genetic study of streptococcal immunoglobulin A1 proteases: evidence for recombination within and between species. *Infect Immun* 1998;66(1):181-90.
24. Kõnönen E, Jousimies-Somer H, Bryk A, Kilp T, Kilian M. Establishment of streptococci in the upper respiratory tract: longitudinal changes in the mouth and nasopharynx up to 2 years of age. *J Med Microbiol* 2002;51(9):723-30.
25. Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu L, et al. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* 1998;4(5):601-6.
26. Bamman LL, Gibbons RJ. Immunoglobulin A antibodies reactive with *Streptococcus mutans* in the saliva of adults, children, and preterm infants. *J Clin Microbiol* 1979;10:538-43.
27. Quan CP, Berman A, Pires R, Avrameas S, Bouvet JP. Natural polyreactive secretory immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infection in humans. *Infect Immun* 1997;65:3997-4004.
28. Smith DJ, Taubman MA. Ontogeny of immunity to oral microbiota in humans. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992;3:109-33.
29. Jiménez E, Fernández I, Martín ML, Martín R, Odriozola JM, Nuño-Palop C, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 2005;51(4):270-4.

ANEXO 5 (Artigo em fase de preparação para publicação)*Salivary levels of cytokines in preterm and fullterm neonates.*

MARIA LUCIA TALARICO SESSO¹, MARIANA CASTRO LOUREIRO BORGES¹,
VIRGINIA PAES LEME FERRIANI¹, RUCHELE DIAS NOGUEIRA^{1,2*},

Department of Pediatrics, Medical School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil¹, University of Uberaba, Minas Gerais, Brazil²

Running title: Salivary cytokines and prematurity

*Contact Information for corresponding author

Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto

Departamento de Puericultura e Pediatria

Av. dos Bandeirantes, 3900

CEP 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil

Phone: 55 16 3602 2902

Fax: 55 16 3602 2297

e-mail: ruchele_nogueira@yahoo.com.br

Abstract

Objectives: Cytokines are peptides secreted by cells of immune response that regulate the activation and the effector phases of inflammatory response. Little is known about the ontogeny of the cytokines in saliva of fullterm (FT) and especially preterm (PT, with less than 37 weeks gestation) newborn known to have an immunological immaturity. Previous studies showed that newborn had detectable levels of IgA in salivas at birth and those levels were higher in fullterm children, which might influence the establishment of the oral microbiota. The aim of this study was to analyze the levels of four cytokines in saliva samples at birth (T0) and after 3 months (T3) in PT and FT.

Methods: Salivas from 50 infants (25 FT and 25 PT) were collected at T0 and T3. Levels of interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), interleukin 12 (IL-12) and interferon gamma (IFN- γ) were analyzed by Luminex® multiplex assay. Clinical evaluation and social-economic data were assessed through questionnaires.

Results: The results showed that all cytokines could be detected at birth in levels higher than founded in T3. The mean levels and frequency of detection of cytokines were significantly higher in PT ($P < 0.05$) than FT at T0. Analysis of clinical data of birth and mother health during the pregnancy showed that the preterm children were more subjected to situations of stress and/or infection, showing a positive correlation with levels of IL-6 and IL-10 respectively.

Conclusion: The results suggest that salivas of newborn present detectable levels of cytokines and that the prematurity may lead to differences in the frequency and levels of detection of cytokines.

Keywords: Prematurity, Cytokines, Saliva.

1. INTRODUCTION

Cytokines are peptides secreted by cells of immune response to regulate the activation and effector phases of inflammatory response⁵. The response of several cytokines (i.e., IFN- α , IFN- β , TNF- γ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15) plays an important role in the protection of oral mucosa together with the adaptative immune response, represented mainly by salivary IgA³⁹ that can control the oral cariogenic microflora³⁰ by reducing the adherence of bacteria to the oral mucosa and dental surface²³. There are proinflammatory cytokines, such as: IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF, IFN- γ , which stimulate inflammation directly or by production of others²⁷. Also, there are the anti-inflammatory cytokines: IL-4, IL-10 and IL-13, which attenuate the inflammation by restricting the production of inflammatory cytokines and increase expression of soluble receptors⁴¹.

These peptides can be released in response to microorganisms and other antigen aggressors³³ playing an important role in controlling the antigenic challenges, especially the interleukin activating group of the response of T helper type 1: IL-12 and IFN- γ , which determine the activation of secretory IgA (SIgA) response against different infectious agents^{1,3,4}. The specific production of interleukins into the oral cavity appears to be related to microbial challenge, whereas gram-negative bacteria induced the production of IL-10 but not IL-12 and IFN- γ in mononuclear cells; some gram-positive bacteria (e.g. *Streptococcus mutans* and staphylococci) stimulated the production of high levels of IL-12 and IFN- γ but not IL-10^{13, 16, 24}. The production of IL-6 may be easily induced by various stimuli such as viral infection, bacterial antigens, among others^{11,47,48}.

Several factors may influence the development of an effective mucosal immune response, including nutritional status, breast feeding, gestational age, exposure to antigens and genetic factors, stress²⁴. Risk factors associated with preterm birth and effects on life and development of newborns are targets of numerous studies. But, little is known about the development of the mucosal immune system in early life, especially in premature infants, which are known to have an immune deficiency at birth. Newborns are known to have a higher frequency of microbial infections than older children and adults, due to the immaturity of the immune system^{8,40}, especially babies born prematurely who have five times higher susceptibility to bacterial infections^{9,20}. Previously, our study with newborns showed that salivary IgA could be detected at birth and their levels were 2.5-fold higher in fullterm than in preterm children³¹ in the first hours of life, being a difference that disappeared by 3 months of

age. These data suggested that prematurity could influence the ontogeny of immune response³¹. Several studies with samples of serum, plasma, amniotic liquid and cervicovaginal fluid showed a positive correlation between increased proinflammatory cytokines, particularly IL-6, with prenatal intrauterine infection^{10,14}, preterm birth when compared to levels found at term birth^{14,15,22,49} and neonatal brain damage^{10,51}. Also, increased levels of IL-10^{6,38} and IL-6^{7,19,26,28,52} in preterm infants have been considered as prognostic indicators of neonatal sepsis.

In saliva, studies showed changes in the salivary levels of selected cytokines in inflammatory diseases in adults, such as: periodontal disease^{12,17,29,42,46,50}, Crohn's disease⁴⁵, lichen planus^{36,53}. In children, increased levels of IL-6 were found in subjects submitted to some kind of stress, such as sleep deprivation³⁵ and mental problems¹⁸. So, there are relatively few studies and results consistentes in the literature that elucidate the association of inflammatory mediators in saliva with adverse pregnancy outcomes and children, especially neonates. The identification of markers of the status of the immune response by detection of immunoglobulins and cytokines may give information about susceptibility to various infections and ontogeny of mucosal immune system, especially because the non-invasive sampling and easy access of saliva have some obvious advantages compared with blood-based analyses^{21,44} and is a very useful tool for studying the immune response, enabling the analysis of maturation of the mucosal immune response and immune response specific, since saliva has satisfactory levels of immunoglobulins, cytokines and antimicrobial peptides^{32,37}.

In this study, we characterized the levels of cytokines proinflammatory: IL-6, IL-12 and IFN- γ and anti-inflammatory: IL-10 in samples salivas of children newborn fullterm (FT) and preterm (PT) at birth and after 3 months of life.

2. Material and Methods

2.1. Patients and study design.

A total of 50 (25 FT and 25 PT) newborn children in the Hospital of the Medical School of Ribeirao Preto, Brazil were enrolled in this study in two visits with 3 months of interval (T0= *baseline*, at birth and T3= 3 months follow-up), under mothers consent for their participation. The Ethical Committee of the Medical School of Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil (process number: 2963/2007), approved this study. To be included in the study

population, only healthy newborns with less than 10 hours of life were included in this study. Children with congenital malformations, perinatal hypoxia, intracranial hemorrhage, with length or weight incompatible with gestational ages, or under antibiotic therapy were excluded from this study. Gestational age was estimated from the reported date of last menstruation period and somatic evaluation. Information on gestational background, health of mother and newborn was obtained by interviewing the mother and clinical data. Fullterm and preterm children were born at mean gestational ages of 39.1 (SD: 1.22, range: 37 to 41) and 34.3 (SD: 2.19, range: 30 to 36.5) weeks respectively. All children were delivered by cesarean section.

2.2. Collection of samples

Samples of whole saliva unstimulated were collected using sterile polypropylene transfer pipettes. Collections were performed in all children at approximately 4-10 hours after birth in order to standardize the collection and the oral microbial exposure, and at least 3 hs after breastfeeding to avoid contamination with non-salivary components, but in four children (3 FT and 1 PT) saliva samples were collected before the first breastfeeding. Solution of 250mM EDTA, pH 5.2 (Sigma, St Louis, MO, USA) was added to each sample prior to transport on ice to the laboratory where they were stored at -80°C until analysis.

2.3. Quantification of Cytokines Using Luminex

Cytokine levels were determined using a multiplexed bead immunoassay. Salivas were diluted 1:16 in PBS-BN (PBS [Sigma], 1% bovine serum albumin [Sigma], 0.05% sodium azide [pH 7.4]), then filtered on 0.22 μM centrifuge tube filters (Spin-X, Costar) at 10,000 RPM for 10 min. Four cytokines: IL-6, IL-10, IL-12 and IFN- γ were measured using the human high sensitivity cytokine of four-plex antibody bead kit (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). The assays were performed in 96 well, 1.2 μm -pore-size filter plates (Millipore). Briefly, the filter plate was pre-wetted with washing buffer and the solution was aspirated from the wells by vacuum. Microsphere beads coated with monoclonal antibodies against the 4 different cytokines were added to the wells. Samples and standards were pipetted into the wells and incubated for 2 h with the beads. The wells were washed using a vacuum manifold and biotinylated secondary antibodies were added. After incubation for 2 h, beads were

washed followed by an incubation of 30 min with streptavidin conjugated to the fluorescent protein, R-phycoerythrin (streptavidin-RPE). After washing to remove the unbound streptavidin-RPE, the beads (minimum of 100 per analyze) were analyzed in the Luminex 100™ instrument (MiraiBio, Alameda, CA). Samples below the detection limit of the assay were recorded as zero, while samples above the upper limit of quantification (ULQ) of the standard curves were assigned the highest value of the curve.

2.4. Levels of salivary Immunoglobulin A and M

Total levels of IgA and IgM were determined in capture ELISA assays as previously described^{30,31}.

2.5. Data Analysis

Significance of statistical differences in the levels of salivary cytokines and data about health and stress between groups and visits was examined using the Mann-Whitney test. Qui-square test was used to analyze differences in the frequency of positive response of each cytokines between groups and data of questionnaires. Spearman correlation was used by comparison between levels of cytokines, IgA levels and data of health. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1. Levels of IgA and IgM.

Immunoglobulin A and IgM were detected in all saliva samples tested (n=50). There were statistically significant differences in levels of salivary IgA between PT (median: 0.86, interquartile range [IQR]: 0.56-1.48) and FT (median:1.18, IQR: 0.57-2.75) (Mann-Whitney test, *P*<0.05). A positive correlation was observed between salivary levels of IgA and IgM in each group (Spearman's *r*>0.75, *P*<0.01).

3.2. Levels of interleukins: IL-6, IL-10, IL-12 and IFN- γ in saliva samples.

The fluctuations of mean levels of cytokines in samples salivas are shown in Figure 1. The distribution of mean, median levels, and frequency of positive detection of each interleukin at T0 and T3 in the groups of preterm and fullterm children are showed in the Figure 2.

In the first visit (T0), the levels of IFN, IL-10, IL-12 and IL-6 were significantly higher in preterm than in fullterm children (Mann-Whitney, $P < 0.05$). There were significant differences between groups in the frequency of children with positive detection of IFN- γ , IL-10, IL-12 (Qui Square test, $q > 7.01$; $P < 0.05$), in that, preterm showed more frequently detectable levels of these interleukins. All children presented the IL-6 in samples salivas in both groups. There were positive correlations between IL-12 with all others interleukins (Spearman Correlation, $r > 0.56$, $P < 0.05$) in preterm, which do not happen in fullterm children. There were no correlation between levels of interleukin and immunoglobulins A and B in both groups (Spearman Correlation, $r < 0.11$, $P > 0.05$).

In T3 there were no statistically significant differences in the mean levels of interleukin IL-10, IL-12 and IL-6 between groups (Mann-Whitney, $P > 0.05$). On the other hand, preterm showed levels increased of IFN- γ (Mann-Whitney, $P > 0.05$) than in fullterm. The cytokines IL-6 and IL-10 were significantly more detected in FT ($n=19$) than in PT ($n=12$) (Qui Square test, $q=6.2$; $P < 0.05$). In opposite, all children from FT group did not present detectable levels of IFN- γ , while 8 children had positive response to this interferon in PT group (Qui Square test, $q=11.5$; $P < 0.01$). There were no significant differences in the number of PT ($n=13$) and FT ($n=10$) children with IL-12 undetectable (Qui Square test, $q=0.03$; $P > 0.54$). There were positive correlations between levels of IL-10 and IL-12 in both groups (Spearman Correlation, $r > 0.56$, $P < 0.05$). There were no correlation between levels of interleukin and immunoglobulins A and M in both groups (Spearman Correlation, $r < 0.08$, $P > 0.05$).

The prospective analysis showed that in PT the levels of interleukins decreased significantly (Mann-Whitney, IL-10: $P=0.009$, IL-12: $P=0.001$, IL-6: $P=0.001$) from T0 to T3, which do not happen with the level of IFN- γ that increasing (Mann-Whitney: $P=0.03$). In the group of FT children there was a decreasing statistically significant difference from T0 to T3 for IL-12 and IL-6 (Mann-Whitney, $P < 0.05$). For the others cytokines IL-10 and IFN- γ no statistically significant differences were found (Mann-Whitney, $P > 0.11$) between visits.

3.2. Correlation between clinical information with cytokines levels.

Analysis of interviews with mothers and of clinical evaluation allowed collecting several data about maternal health during the gestation and the delivery and clinical development of newborn after the birth. Those data allowed knowing if the newborn were submitted to some type of stress (such as hypoglycemia, time of rupture of membrane higher than 18 hours) and/or of contact with bacterial infection in the intrauterine life (such as chorioamnionitis and maternal urinary infection) or after birth. Those data were correlated with levels of interleukin found in the samples salivas collected at T0.

The results showed that in PT group, six and 12 children presented respectively bacterial infection by gram-positive bacteria (streptococci and staphylococci) and stress after birth. Twelve mothers of PT presented infection during the pregnancy, such as urinary infection and chorioamnionitis. While in FT group, only 2 children presented bacterial infection after birth and others 3 had mother with infection during gestation period. There were differences statistically significant between groups of PT and FT in relation to contact with infection ($n=11$ and 3 , PT and FT respectively, Qui-Square, $P<0.05$, $q=6.34$) and stress after birth ($n=12$ and 2 , PT and FT respectively, Qui-Square, $P<0.05$, $q=9.92$).

The analysis of correlation between clinical data and levels of interleukins showed that in the PT group, there were a positive correlation between levels of IL-6 with stress (Mann-Whitney, $P<0.05$) and IL-10 with infection after birth (Mann-Whitney, $P<0.05$). In FT, only, there was a positive correlation between levels of IL-10 with infection (Spearman Correlation, $P<0.05$).

4. DISCUSSION

Risk factors associated with preterm birth and effects on life and development of newborns are targets of numerous studies. Little is known about the development of the mucosal immune system in early life, especially in premature infants, which are known to have an immunological deficiency at birth. Whereas most studies measure cytokines in blood samples, our interests were analyzed levels and frequency of detection of cytokines in minimally invasive measurement approach by the saliva collection. The internal validity of saliva measurements of immune markers, including ILs, have been documented in the literature, but serum-saliva correlations are modest and the extent to which salivary IL

reflects broader, systemic immune activation when compared with localized oral activation is not yet established³⁵. The present study will shed light on whether salivary is also linked with prematurity.

The identification of markers of the status of the immune response, especially in newborn infants by detection of immunoglobulin and cytokines may give information about their susceptibility to various infections. Previously, our study, with the same population, showed that IgA can be detected in saliva at birth and the total levels of this immunoglobulin were higher in FT (up to 2.5-fold) than PT³¹. Also, the complexity of salivary IgA against oral bacterial species in preterm can be responsible by a delay in IgA responses at initial stages of antigenic challenge³¹. Here we investigated levels of cytokines in samples salivas of children at birth and after three months of age in preterm and fullterm.

The results of the present study were showed that the mean levels of salivary cytokines were higher in T0 than in T3 in both groups. There were some differences in the patterns of detection of cytokines in the samples of saliva analyzed between groups, as in relation to the mean levels, as in the frequency of positive detection of cytokines. At T0, the mean levels of all cytokines were significantly higher in PT than in FT group. Excepting the IL-6 that were detected in all children, others cytokines were more frequently detected in PT. After 3 months, also there were some differences between groups, especially in relation the IFN, because 32% of PT-children showed levels detected in the saliva and their mean levels increased from T0 to T3, which do not happen in FT group, in that no one child presented this interferon.

There is little information in the literature with respect to cytokines in salivas, especially in newborns. The majority of studies focuses sample of serum and plasma to detection these cytokines^{7,28,52}. The increase of levels of IL-10 in serum were detected in premature infants with sepsis^{6,38} and of IL-6 in umbilical cord blood in newborns with early onset neonatal sepsis with maternal chorioamnionitis^{7,28,52}. Thus, IL-6 and IL-10 are important inflammatory biomarkers of neonatal sepsis in serum¹. Here, the levels of IL-10 in saliva presented a positive correlation with infection in both groups. In this way, the increased levels of those cytokines in PT can be associated with microbial stimuli *in utero*, which may be the reason for premature rupture of the amniotic membrane. Also, the results showed a positive correlation between levels of IL-6 and stress in PT groups, which is in according to a study with children of 8-9 years old, who suffered some kind of stress, such as sleep deprivation, that showed increased levels of IL-6 in salivas when compared with those not under stress³⁵.

Also, Keller and coworkers (2010)¹⁸ indicated that greater levels of salivary IL-6 were associated with children's mental health (such as depression and anxiety).

So, the present study contributes to the understanding of ontogeny of mucosal immune system in recent life, but longitudinal comparisons of cytokines in samples salivas of PT and FT infants could be helpful to clarify the extension to which this difference is maintained over time. Although the objectives of the present study did not include the analysis of causes of prematurity, the clinical data allowed suggesting that infection and stress can change the levels of cytokines in oral cavity, especially in PT children, who were more subjected to stimulus infectious and situations of stress. Also, the results were similar to found in samples of blood, which confirms the needs for further studies about the mucosal immune system by using of saliva as a source of diagnostic, fast and non invasive, which may represent a "mirror of body" in health and disease since saliva has satisfactory levels of immunoglobulins, cytokines and antimicrobial peptides^{32,37}.

In summary, detectable levels of salivary cytokines can be detected within the first hours after birth and their mean levels decreased after 3 months. Furthermore, the salivary cytokines concentrations appear to be influenced by the gestational age, which might reflect a stress situation and/or antigenic microbial challenge, not locally (because the undetectable levels of bacteria in the samples), but probably, due to conditions during the pregnancy or after birth.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), proc. 07/57346-5, and proc. 07/50807-7 and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), proc. 472928/2007-4. We thank Dr. Daniel James Smith from The Forsyth Institute, Boston, Massachussets for allowing use of the Luminex equipment and Willian King for the excellent technical assistance.

References

1. Bender L, Thaarup J, Varming K, Krarup H, Ellermann-Eriksen S, Ebbesen F. Early and late markers for the detection of early-onset neonatal sepsis. *Dan Med Bull.* 2008;55(4):219-223.
2. Berkowitz, R.J.; Turner, J.; Green, P. Primary oral infection of infants with *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1980; 25:221-224.
3. Boyaka PN, Lillard JW Jr, McGhee J. Interleukin 12 and innate molecules for enhanced mucosal immunity. *Immunol Res.* 1999; 20(3):207-17.
4. Bradney CP, Sempowski GD, Liao HX, Haynes BF, Staats HF. Cytokines as adjuvants for the induction of anti-human immunodeficiency virus peptide immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies in serum and mucosal secretions after nasal immunization. *J Virol.* 2002; 76(2):517-524.
5. Broz P, Monack DM. Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections. *Immunol Rev.* 2011 Sep;243(1):174-90.
6. Cancelier AC, Petronilho F, Reinke A, Constantino L, Machado R, et al. Inflammatory and oxidative parameters in cord blood as diagnostic of early-onset neonatal sepsis: a case-control study. *Pediatr Crit Care Med.* 2009; 10: 467–471.
7. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, Osborn JF, Signore F, Assumma M, et al. C-Reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. *Clin Chem.* 2003; 49:60-68.
8. Clapp DW. Developmental regulation of the immune system. *Semin Perinatol.* 2006; 30(2):69-72.
9. Clapp DW, Baley JE, Gerson SL. Gestational age-dependent changes in circulating hematopoietic stem cells in newborn infants. *J. Lab. Clin. Med.* 1989; 113:422-427
10. Dammann O, Leviton A. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res.* 1997 Jul;42(1):1-8.
11. Fong Y, Moldawer LL, Marano M, Wei H, Tatter SB, Clarick RH, Santhanam U, Sherris D, May LT, Sehgal PB, Lowry SF. Endotoxemia elicits increased circulating 02-IFN/IL-6 in man. *J. Immunol.* 1989; 142:2321-2324.
12. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of Interleukin- 1 β , -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol.* 2000; 10:1536-1546.
13. Hahn CL, Best AM, Tew JG. Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infect Immun.* 2000, Dec; 68(12):6785-9.
14. Holst RM, Mattsby-Baltzer I, Wennerholm UB, Hagberg H, Jacobsson B. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical fluid in a population of Swedish women in preterm labor: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation, and preterm delivery. *Acta ObstetGynecolScand.* 2005 Jun;84(6):551-7
15. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Hagberg H. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the chorioamniotic membranes. *BJOG.* 2005 Jun;112(6):719-24
16. Jiang Y, Magli L, Russo M. Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo. *Infect Immun.* 1999; 67(5):2125-30.
17. Johnson RB, Serio F.G. Interleukin 18 concentrations and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol.* 2005; 5:785-790.
18. Keller PS, El-Sheikh M, Vaughn B, Granger DA. Relations between mucosal immunity and children's mental health: the role of child sex. *PhysiolBehav.* 2010;101(5):705-12.

19. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*. 1989; 74:1-10.
20. Kliegman RM, Rottman CJ, Behrman RE. Strategies for the prevention of low birth weight. *Am J ObstetGynecol*. 1990; 162(4):1073-83.
21. Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *J CanadDental Assoc*. 2002; 68: 170-174.
22. Lyon D, Cheng CY, Howland L, Rattican D, Jallo N, Pickler R, Brown L, McGrath J. Integrated review of cytokines in maternal, cord, and newborn blood: part I--associations with preterm birth. *Biol Res Nurs*. 2010 Apr;11(4):371-6.
23. Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *MicrobiolMolBiol Rev*. 1998; 62:71-109.
24. Maruyama K, Hida M, Kohgo T, Fukunaga Y. Changes in salivary and fecal secretory IgA in infants under different feeding regimens. *Pediatr Int*. 2009; 51:342-345.
25. Mason D, Powrie F. Control of immune pathology by regulatory T cells. *CurrOpinImmunol*. 1998; 10(6):649-55.
26. Mehr S, Doyle LW. Cytokines as marker of bacterial sepsis in newborn infants: a review. *Pediatr Infect Dis J*. 2000; 19:879-87.
27. Meirovitz A, Kuten M, Billan S, Abdah-Bortnyak R, Sharon A, Peretz T, Sela M, Schaffer M, Barak V. Cytokines levels, severity of acute mucositis and the need of PEG tube installation during chemo-radiation for head and neck cancer: a prospective pilot study. *RadiatOncol*. 2010;25:5-16.
28. Naccasha N, Hinson R, Montag A, Ismail M, Bentz L, Mittendorf R. Association between funisitis and elevated interleukin-6 in cord blood. *ObstetGynecol*. 2001; 97:220-4.
29. Napimoga MH, Nunes LH, Maciel AA, Demasi AP, Benatti BB, Santos VR, Bastos MF, de Miranda TS, Duarte PM. Possible involvement of IL-21 and IL-10 on salivary IgA levels in chronic periodontitis subjects. *Scand J Immunol*. 2011 Dec;74(6):596-602
30. Nogueira RD, Alves AC, Napimoga MH, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. *Infect Immun*. 2005; 73(9):5675-5684.
31. Nogueira RD, Sesso ML, Borges MC, Mattos-Graner RO, Smith DJ, Ferriani VP. Salivary IgA antibody responses to *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* in preterm and fullterm newborn children. *Arch Oral Biol*. 2011 Dec 12.
32. Nurkka A, Ahman H, Korkeila M, Jantti V, Kayhty H, Eskola J. Serum and salivary anti-capsular antibodies in infants and children immunized with the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2001; 20(1):25-33.
33. Park AY, Scott P. IL-12: keeping cell-mediated immunity alive. *Scand J Immunol*. 2001; 53:529-32.
34. Rang A, Heise T, Will H. Lack of a role of the interferon-stimulated response element-like region in interferon alpha -induced suppression of Hepatitis B virus *in vitro*. *J Biol Chem*. 2001;276(5):3531-5.
35. Redwine L, Hauger RL, Gillin JC, Irwin M. Effects of sleep and sleep deprivation on interleukin-6, growth hormone, cortisol, and melatonin levels in humans. *J ClinEndocrinolMetab*. 2000;85(10):3597-3603.
36. Rhodus NL, Cheng B, Myers S, et al. A comparison of the pro-inflammatory, NF-kappaB-dependent cytokines: TNF-alpha, IL-1-alpha, IL-6, and IL-8 in different oral fluids from oral lichen planus patients. *ClinImmunol*. 2005; 114: 278-283.
37. Rohan LC, Edwards RP, Kelly LA, Colenello KA, Bowman FP, Crowley-Nowick PA. Optimization of the weck-Cel collection method for quantitation of cytokines in mucosal secretions. *ClinDiagn Lab Immunol*. 2000; 7(1):45-48.

38. Romagnoli C, Frezza S, Cingolani A, De Luca A, Puopolo M, et al. Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. *Eur J Pediatr*. 2001; 160: 345–350.
39. Russell MW, Hajishengallis G, Childers NK, Michalek SM. Secretory immunity in defense against cariogenic *mutans streptococci*. *Caries Res*. 1999; 33: 4-15.
40. Sadeghi K, Berger A, Langgartner M, Prusa AR, Hayde M, Herkner K, Pollak A, Spittler A, Forster-Waldl E. Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling. *J Infect Dis*. 2007 Jan 15;195(2):296-302
41. Sarrouh BF, Rivaldi D, Gambarato BC, Santos DT e Silva SS. Importância das citocinas no sistema imunológico: propriedades e características funcionais. *Revista Analytica*. 2007; 32:42-48.
42. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here. *Acta Odontol Scand*. 2001; 59: 167-173.
43. Smith DJ, Taubman MA. Ontogeny of immunity to oral microbiota in humans. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1992; 3:109-133.
44. Streckfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis*. 2002; 8: 69-76.
45. Szczeklik K, Owczarek D, Pytko-Polończyk J, Kęsek B, Mach TH. Proinflammatory cytokines in the saliva of patients with active and non-active Crohn's disease. *Pol Arch Med Wewn*. 2012;122(5):200-8
46. Teles RP, Likhari V, Socransky SS, Haffajee AD. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *J Periodontal Res*. 2009; 44: 411-417.
47. Ueno Y, Takano N, Kanegane H, Yokoi T, Yachie A, Miyawaki T, Taniguchi N. The acute phase nature of interleukin 6: studies in Kawasaki disease and other febrile illnesses. *Clin Exp Immunol* 1989; 76:337-342.
48. Van Damme J, Opdenakker G, Simpson RJ, Rubira MR, Cayphas S, Vink A, Billiau A, Van Snick J. Identification of the human 26-kD protein, interferon P2 (IFNP2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 1987; 165:914-919.
49. Wei SQ, Fraser W, Luo ZC. Inflammatory cytokines and spontaneous preterm birth in asymptomatic women: a systematic review. *Obstet Gynecol*. 2010 Aug;116(2 Pt 1):393-401
50. Yamazaki K, Nakajima T, Kubota Y, Gemmell E, Seymour GJ, Hara K. Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 1997; 12:281-287.
51. Yoon BH, Jun JK, Romero R, Park KH, Gomez R, Choi JH, Kim IO. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol*. 1997 Jul;177(1):19-26
52. Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim M, Oh SY, Kim CJ, et al. The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin-6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis. *Am J Obst Gynecol*. 2000; 183:1124-9.
53. Zhang Y, Lin M, Zhang S, et al. NF-κB-dependent cytokines in saliva and serum from patients with oral lichen planus: A study in an ethnic Chinese population. *Cytokine*. 2008; 41: 144-149.

LEGENDS, FIGURES AND TABLES

Figure 1. Fluctuation of mean levels of cytokines IFN- γ (A), IL-10 (B), IL-12 (C) and IL-6 (D) in pg/ml in samples salivas of 25 fullterm (FT) and 25 preterm (PT) children at birth (T0 and after 3 months follow-up (T3).

Figure 2. Distribution of mean, standard deviation (SD), median levels and frequency of children with positive detection of the cytokines IFN- γ , IL-10, IL-12 and IL-6 in 25 pairs of FT (fullterm) and PT (preterm) in the first visit (T0) and after three months (T3) in saliva samples of children studied.

<i>Cytokines</i>	T0		T3	
	PT	FT	PT	FT
IFN				
<i>Mean</i>	4.67*	0.17*	6.88*	0.00*
<i>SD</i>	9.16	0.57	12.17	0.00
<i>Median</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Number of children with positive response (%)</i>	12 (48)**	2 (8)**	8 (32)**	0 (0)**
IL10				
<i>Mean</i>	17.03*	4.25*	6.10	5.85
<i>SD</i>	14.79	5.53	11.16	6.64
<i>Median</i>	18.65	0.00	0.00	4.56
<i>Number of children with positive response (%)</i>	21 (84)**	12 (48)**	12 (48)**	19 (76)**
IL12				
<i>Mean</i>	15.60*	7.34*	4.37	2.06
<i>SD</i>	11.87	8.64	8.66	2.45
<i>Median</i>	13.53	3.80	0.00	1.09
<i>Number of children with positive response (%)</i>	25 (100)**	20 (80)**	12 (48)	15 (60)
IL6				
<i>Mean</i>	21.60*	18.18*	2.49	2.03
<i>SD</i>	29.50	37.63	4.11	2.50
<i>Median</i>	9.88	4.88	0.00	1.89
<i>Number of children with positive response (%)</i>	25 (100)	25 (100)	12 (48)**	19 (76)**

* Difference statistically significant (Mann-Whitney, $P < 0.05$)

** Difference statistically significant (Qui Square test, $P < 0.05$, $q > 0.50$)