Marcela Yang Hui Zi

Efeitos da infecção experimental por *Porphyromonas gingivalis e Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no padrão de prenhez de camundongos e em marcadores inflamatórios

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

Marcela Yang Hui Zi

Efeitos da infecção experimental por *Porphyromonas gingivalis e Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no padrão de prenhez de camundongos e em marcadores inflamatórios

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer

Versão Original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Zi, Marcela Yang Hui.
Efeitos da infecção experimental por Porphyromonas gingivalis e Aggregatibacter actinomycetemcomitans no padrão de prenhez de camundongos e em marcadores inflamatórios / Marcela Yang Hui Zi. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Marcia Pinto Alves Mayer.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Virulência de organismos periodontais e resposta imune.

Versão do título para o inglês: Effects of experimental infection with Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans in mice pregnancy pattern and inflammatory markers.

1. Doença periodontal experimental 2. Porphyromonas gingivalis 3. Aggregatibacter actinomycetemcomitans 4. Gestação 5. Marcadores inflamatórios I. Mayer, Marcia Pinto Alves II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0106/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marcela Yang Hui Zi.

Título da Dissertação: Efeitos da infecção experimental por Porphyromonas gingivalis e Aggregatibacter actinomycetemcomitans no padrão de prenhez de camundongos e em marcadores inflamatórios.

Orientador(a): Marcia Pinto Alves Mayer.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **06** nas fls. **15** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Marcia Pinto Alves Mayer,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos da doença periodontal experimental induzida por Porphyromonas gingivalis e Aggregatibacter actinomycetemcomitans na unidade feto-placentária e em marcadores inflamatórios sistêmicos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Marcela Yang Hui Zi, Priscila Larcher Longo, Ellen S.Ando-Suguimoto,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **18.03.2014, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 24 de março de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

EXPEDIÇÃO
DATA 03/04/2014
REL. N.º 991

Dedico este mestrado primeiramente a Deus, sem sua força nada conseguiria.

À minha família, meus pais, Yang Yong Ting e Lin Jie Fang por terem me dado apoio, ensinamentos , palavras de incentivo e suporte por toda essa jornada, meus irmãos Eduardo Yang Zi Leong e Stephen Zi Chyi Lin Yang por toda a força e incentivo, sem eles não seria o que sou.

Aos familiares e amigos pelo apoio, incentivo e compreensão em toda essa jornada.

A vitória desta conquista dedico com todo o meu amor a todos vocês.

Agradecimentos

À Deus por iluminar meus caminhos, concedido oportunidades e me mantido firme nesta jornada

À minha orientadora Profa. Marcia Mayer, por ter me acolhido, incentivado, passado seus conhecimentos técnicos e científicos, mas principalmente pelo carinho, conselhos e conhecimento de vida que me deu como se fosse filha. Agradeço por cada momento em que pudemos passar juntas, guardarei cada momento com muito carinho em minha memoria e coração

À minha família, tios, primos e também aos amigos pelo incentivo constante.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao departamento de Microbiologia, sempre com admiração e respeito.

Agradeço ao apoio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado São Paulo (FAPESP) processo nº 2014/10549-2

Aos meus amigos de laboratório Adriana, Bruno, Cintia, Dione, Ellen, Éricka, Glaucia, Karin, Lucas, Maike, Mariana, Mouna, Natália, Pâmela, Paola, Priscila, Silvia e Victor pela amizade e ajuda, vocés me fizeram fazer parte de uma família, obrigada pelo carinho sempre.

Aos técnicos de laboratório João Paulo e Leo por toda ajuda e apoio.

À todos os professores e colegas do departamento de Microbiologia pela ajuda e por
compartilharem os bons momentos
.
À secretaria de pós-graduação e ao comitê de ética pelo apoio.

Aos funcionários da biblioteca do ICB pela ajuda.

A todos que colaboraram e me ajudaram a realizar este trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos!

As coisas mais maravilhosas que podemos experimentar sãs as coisas misteriosas. Elas são a origem de toda verdadeira arte e ciência. Aquele para quem essa sensação é um estranho, aquele que não mais consegue parar para admirar e extasiar-se em veneração, é como se estivesse morto: seus olhos estão fechados.” Albert Einstein

Resumo

Zi MYH. Efeitos da infecção experimental por *Porphyromonas gingivalis e Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no padrão de prenhez de camundongos e em marcadores inflamatórios. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Dados epidemiológicos sugerem a relação entre periodontite e partos prematuros e recém-nascidos de baixo peso, mas pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos nesta associação. A microbiota associada à periodontite é bastante complexa e *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* são considerados patógenos periodontais. O potencial de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* em induzir alterações sistêmicas ainda não foi totalmente compreendido. Este estudo pretende contribuir para a compreensão da relação entre a infecção com patógenos periodontais e efeitos adversos na gestação pela determinação do efeito da infecção experimental por *P. gingivalis* e *A.actinomycetemcomitans* sobre o padrão de prenhez, nível de citocinas e presença do patógeno na unidade fetoplacentária, em camundongos.

O efeito da doença periodontal experimental induzida por *P. gingivalis* HW24 D-1 na prenhez foi determinado em camundongos fêmeas da linhagem C57BL6. *P. gingivalis* HW24 D-1 (10^8UFC) foi inoculada por gavagem oral por 5 dias 2X/dia em animais do grupo teste (n=9) enquanto o controle (n=5) recebeu apenas o veículo, na mesma forma, volume e períodos utilizados para o grupo teste. Vinte e um dias após a primeira inoculação oral, os animais cruzaram e a prenhez foi confirmada. No 16º dia da prenhez, os animais foram sacrificados e determinados o perfil de citocinas séricas, placentárias e no tecido gengival por ELISA, a perda de osso alveolar por micro-tomografia (microCT), e a presença de *P. gingivalis* por qPCR em amostras de biofilme oral e tecido gengival, sangue, soro, fígado, intestino, fezes, feto, placenta e líquido amniótico.

Devido à falta de um modelo apropriado de periodontite induzida por *A.actinomycetemcomitans* em camundongos, a infecção foi realizada pela injeção intravenosa de 10^9UFC de *A. actinomycetemcomitans* clone JP2 em camundongos prenhes (teste, n=6) nos 3º, 5º, 7º, 11º e 15º dias da prenhez, enquanto o controle recebeu apenas o veículo (n=5). No 16º dia da prenhez, os animais foram sacrificados e *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em amostras de soro, sangue, placenta, feto e líquido amniótico, e foi determinado o nível de citocinas em amostras de soro e placenta.

Em ambos os modelos foi avaliado o efeito de infecção sobre o ganho de peso materno, peso e número de fetos e presença de reabsorção fetal, comparando-se animais teste e controle.

No modelo de *P. gingivalis*, foi induzida periodontite, caracterizada por perda óssea alveolar, visto que a distância entre a junção esmalte-cemento até a crista óssea alveolar foi maior nos animais no grupo teste do que no controle (Mann Wittney, $p<0,05$). Os animais do grupo teste apresentaram menor peso ao final da prenhez, e menor peso fetal em relação ao grupo controle (Mann Wittney $p<0,05$). *P. gingivalis* foi detectado em todos os animais do grupo teste, sendo detectado em amostras de sangue (5/9), soro (3/9), tecido gengival (1/9), biofilme (4/9), intestino (1/9),fezes (1/9), fígado (4/9), fetos (8/27), placentas (9/27) e líquido amniótico (1/9) do grupo teste e não foi detectado em amostras do grupo controle. Não foi observada diferença significante nos níveis de mediadores inflamatórios entre os

dois grupos, em tecido gengival e soro. Por outro lado, foram observados maiores níveis placentários de IL-1β, INF- γ, IL-10, GMCSF, IL-12p40 e IL-12p70 nos animais teste do que nos controle.

No modelo experimental de infecção por *A. actinomycetemcomitans*, foi detectada a presença da bactéria em pelo menos um dos sítios analisados em todos os animais do grupo teste, em amostras sangue (2/6), soro (1/6), fetos (11/14), placentas (11/14) e líquido amniótico (1/6), e não em amostras do controle. Não houve diferença em parâmetros relacionados à prenhez, como peso e ganho de peso materno, número e peso dos fetos entre os grupos teste e controle. Não foram demonstradas diferenças nos níveis de citocinas séricas entre os dois grupos. No entanto, os níveis placentários, de TNF-α, IL-4 e IL-6 foram maiores no grupo teste do que no controle (Mann Wittney, $p<0,05$).

Os dados indicam que a infecção oral por *P. gingivalis* promove não somente a destruição dos tecidos periodontais, mas o organismo é capaz de alcançar sítios extra-orais, ultrapassar a barreira placentária, e colonizar a unidade feto-placentária, alterar o perfil de mediadores inflamatórios na placenta, resultando em baixo peso fetal.

Os dados também indicam que *A. actinomycetemcomitans* é capaz de ultrapassar a barreira placentária e colonizar a unidade feto-placentária, resultando em alteração no perfil de mediadores inflamatórios na placenta.

Em conjunto, os nossos resultados sugerem que a associação entre periodontite e alterações gestacionais pode ser explicada pela capacidade de patógenos periodontais como *P. gingivalis* e *A.actinomycetemcomitans* ultrapassar a barreira placentária, colonizar e aumentar a produção de mediadores inflamatórios na unidade fetoplacentária, alterando assim o equílibrio imunológico, essencial para o sucesso da gestação.

Palavras-chave: *Porphyromonas gingivalis. Aggregatibacter actinomycetemcomitans.* Doença periodontal experimental. Gestação. Marcadores inflamatórios.

Abstract

Zi MYH. Effects of experimental infection with Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans in mice pregnancy pattern and inflammatory markers. [Masters thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas , Universidade de São Paulo; 2016.

Epidemiological data suggest the relationship between periodontitis and preterm deliveries and infants of low weight but little is known about the mechanisms involved in this association. Periodontitis-associated microbiota is quite complex and *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* are considered periodontal pathogens. The potential of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* to induce systemic changes has not yet been fully understood. This study aims to contribute to the understanding of the relationship between infection with periodontal pathogens and adverse effects on pregnancy for determining the effect of experimental infection with *P. gingivalis* and *A.actinomycetemcomitans* on pregnancy patterns, level of cytokines and the presence of the pathogen in the foetoplacental unit in mice.

The effect of experimental periodontal disease induced by *P. gingivalis* HW24 D-1 in pregnancy was determined in female mice of the C57BL6 strain. *P. gingivalis* HW24 D-1 (10^8 CFU) was inoculated by oral gavage for 5 days twice/day in the animal of the test group (n = 9) while the control (n = 5) received only the vehicle in the same manner, volume and periods used for the test group. Twenty-one days after the first oral inoculation, the animals mated and pregnancy was confirmed. On the 16th day of pregnancy, the animals were sacrificed and the profile of serum cytokines, placental and gingival tissue were determined by ELISA, alveolar bone loss by micro-computed tomography (microCT) and the presence of *P. gingivalis* by qPCR in samples of oral plaque and gingival tissue, blood, serum, liver, intestine, feces, fetus, placenta and amniotic fluid.

Due to lack of an appropriate model of induced periodontitis with A. actinomycetemcomitans in mice, the infection was carried out by intravenous injection with 10^9 CFU of *A. Actinomycetemcomitans*, JP2 clone in pregnant mice (test, n = 6) on the 3th, 5th, 7th, 11th and 15th days of pregnancy, while the control received only the vehicle (n = 5). On the 16th day of pregnancy, the animals were sacrificed and *A. actinomycetemcomitans* was detected by qPCR in samples of serum, blood, placenta, fetal and amniotic fluid, the level of cytokines in serum and placental was determined by ELISA.

In both models, the effects of the infection on maternal weight gain, weight and number of fetuses and presence of fetal resorption were compared within the test and control animals.

In the *P. gingivalis* model, periodontitis was induced, characterized by alveolar bone loss, since the distance between the cemento-enamel junction to the alveolar bone crest was higher in animals in the test group than the control group (Mann Wittney, $p < 0,05$). The animals of the test group had lower weight at the end of pregnancy, significant difference was observed compared to the control group, there were no statistical difference in the number of fetuses per animal pregnant in both groups, but the weight of the fetuses of the test group were lower compared to fetuses in the control group and this was statistically significant. (Mann Wittney $p < 0,05$). *P. gingivalis* was detected by qPCR in all animals of the test group being

detected in blood samples (5/9), saline (3/9), the gingival tissue (1/9) , biofilm (4/9), intestine (1/9), stool (1/9), liver (4/9), fetuses (8/27), placenta (9/27) and amniotic fluid (1/9) of the test group and was not detected in the control group samples. However, there was no significant difference in the levels of inflammatory mediators between the two groups in gingival tissue and serum. On the other hand, they showed higher placental levels of IL-1β, INF-γ, IL-10, GM-CSF, IL-12p40 and IL-12p70 in the test animals than control.

In the experimental model of *A. actinomycetemcomitans* infection, the presence of DNA of the bacteria was detected in at least one of the sites in all animals from the test group by qPCR in blood samples (2/6), serum (1/6), fetus (11/14), placentas (11/14) and amniotic fluid (1/6), and was not detected in control samples. There was no difference in parameters related to pregnancy, such as weight and maternal weight gain, number and weight of fetuses between the test and control groups. No differences were demonstrated in the serum levels of cytokines between the two groups. However, placental levels of TNF-α, IL-4 and IL-6 were higher in test group than in control group (Mann Wittney, $p < 0.05$).

The data indicate that oral infection with *P. gingivalis* promotes not only the destruction of the periodontal tissues, but are capable to achieve extra-oral sites, overcome the placental barrier and colonize the fetal-placental unit, change the mediators profile inflammatory in the placenta, resulting in low birth weight.

The data also indicate that *A. actinomycetemcomitans* is able to overcome the placental barrier and colonize the fetal-placental unit resulting in changes in inflammatory mediators profile in the placenta.

Our results suggest that the association between periodontitis and pregnancy changes can be explained by periodontal pathogens capacity as *P. gingivalis* and *A.actinomycetemcomitans* overcome the placental barrier, colonize and increase the production of inflammatory mediators in the fetoplacental unit, thus changing the immunological balance is essential for successful gestation.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis. Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Experimental periodontal disease. Pregnancy. Inflammatory markers.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Delineamento do estudo experimental em camundongos C57BL6 de avaliação do efeito da doença periodontal induzida por *P. gingivalis* sobre a prenhez……35

Figura 2 - Delineamento do estudo experimental em camundongos C57Bl/6 de avaliação do efeito da infecção por *A.actinomycetemcomitans* sobre a prenhes…..36

Figura 3 - Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão do número de cópias do gene *16SrRNA* de *P.gingivalis* nas amostras do grupo teste, após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez……46

Figura 4 - Valores médios e desvio padrão do peso dos animais prenhes dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis*, em relação aos animais do grupo controle, durante o período de prenhez……47

Figura 5 - Valores médios e desvio padrão do ganho de peso dos animais prenhes dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis*, em relação aos animais do grupo controle, durante o período de prenhez……47

Figura 6 - Valores médios e desvio padrão da porcentagem de ganho de peso dos animais prenhes dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis*, em relação aos animais do grupo controle, durante o período de prenhez……48

Figura 7 - Média do número de fetos e desvio padrão dos animais prenhes dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis*, após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez em relação aos animais do grupo controle ……..49

Figura 8 - Média e desvio padrão do peso dos fetos de cada animal prenhe dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis* após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez em relação aos animais do grupo controle……...50

Figura 9 - Média e desvio padrão dos pesos fetos do grupo teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis* após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez em relação aos animais do grupo controle……50

Figura 10 - Fotografia do animal 362, pertencente ao grupo teste (infectado por *P. gingivalis*) com apenas um feto (A) que apresentou uma deformação (B), comparado com animal controle, animal apresentando 9 fetos (C) feto com tamanho e formatos normais……51

Figura 11- Valores de médias e desvios padrão de mediadores inflamatórios (pg/ml) no soro materno dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis* após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez e do grupo controle……52

Figura 12 - Valores de médias e desvios padrão de mediadores inflamatórios (pg/ml) no tecido gengival materno dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis* após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez e do grupo controle……53

Figura 13 - Valores de médias e desvios padrão de mediadores inflamatórios (pg/ml) nas placenta dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis* após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez e do grupo controle……54

Figura 14 - Fotografias do corte sagital e medida da JEC e a crista óssea- alveolar entre o primeiro e segundo molar superior direito em animal do grupo teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis* após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez e do grupo controle (A) e em animal do grupo controle (B)……..…55

Figura 15 - Valor da média dos valores obtidos na medição entre a JEC e a crista óssea- alveolar entre o primeiro e segundo molar superior direito em animais do grupo teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis* após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez e do grupo controle……56

Figura 16 - Valores de Correlação de Spearman entre variáveis relacionadas a alterações no padrão de prenhez em camundongos dos grupos teste (infectado com *P. gingivalis*) e controle (não infectado) em amostras obtidas no 16º dia da prenhez. Valores de p entre parêntesis. Significante quando p<0,05……..57

Figura 17 - Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão do número de cópias do gene *16SrRNA* de *A.actinomycetemcomitans* nas amostras do grupo teste, animais infectados experimentalmente nos 3º, 7º, 11º e 15º dias de prenhez por *A.actinomycetemcomitans*……59

Figura 18 - Valores médios e desvio padrão do peso dos animais prenhes dos grupos teste, infectados experimentalmente por *A.actinomycetemcomitans*, e controle, durante o período de prenhez……60

Figura 19 - Média do número de fetos e desvio padrão dos animais prenhes do grupo teste, infectado experimentalmente por *A.actinomycetemcomitans* nos 3º, 7º, 11º e 15º dias de prenhez, e do grupo controle……..61

Figura 20 - Média e desvio padrão do peso dos fetos de cada animal prenhe do grupo teste infectado experimentalmente por *A.actinomycetemcomitans* nos 3º, 7º, 11º e 15º dias de prenhez, e do grupo controle……..62

Figura 21 - Média e desvio padrão dos pesos dos fetos do grupo teste infectado experimentalmente por *A.actinomycetemcomitans* nos 3º, 7º, 11º e 15º dias de prenhez e do grupo controle……..62

Figura 22 - Valores de médias e desvios padrão de mediadores inflamatórios (pg/ml) no soro materno do grupo teste infectado experimentalmente por

A.actinomycetemcomitans nos 3º, 7º, 11º e 15º dias de prenhez e do grupo controle……..63

Figura 23 - Valores de médias e desvios padrão de mediadores inflamatórios (pg/ml) na placenta dos animais do grupo teste infectados experimentalmente por por *A.actinomycetemcomitans* nos 3º, 7º, 11º e 15º dias de prenhez e do grupo controle……..64

Figura 24 - Valores de Correlação de Spearman entre variáveis relacionadas a alterações no padrão de prenhez em camundongos dos grupos teste (infectado com *A. actinomycetemcomitans*) e controle (não infectado) em amostras obtidas no 16º dia da prenhez. Valores de p entre parêntesis. Significante quando p<0,05…….65

Figura 25 - Distribuição dos animais teste (infectado com *A.actinomycetemcomitans*) e seu respectivo controle segundo o níveis placentários de IL-4 e ganho de peso materno……...65

Lista de Tabela

Tabela 1 - Seqüências dos iniciadores utilizados para determinação de *P. gingivalis* e de *A. actinomycetemcomitans* e tamanho do produto esperado (Amano et al., 2000; Rudney et al., 2003)……...40

Lista de Abreviaturas e Siglas

Aa - *Aggrebatibacter actinomycetencomitans*

ATCC - American Type Collection

CO_2 - dióxido de carbono

CD4 - cluster de diferenciação 4

CD8 - cluster de diferenciação 8

DC - célula dendrítica

DNA - ácido desoxirribonucleico

DO - densidade óptica

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - ensaio imunoenzimático

FoxP3 - forkhead box P3 (scurfin)

GM-CSF - Fator estimulante de colônas de granulócitos e macrófagos

g - gramas

h - hora

H_2 - gás hidrogênio

IgG - Imunoglulina G

IL-1-β - irterleucina 1 beta

IL-2 - interleucina 2

IL-4 - interleucina 4

IL-6 - interleucina 6

IL-10 - interleucina 10

IL-17α - interleucina 17 alfa

TNF-α - fator de necrose tumoral alfa

IFN-γ - interferon gama

IL-12 p70 - interleucina 12 subunidade 70

IL-12p40 - interleucina 12 subunidade 40

JEC - junção esmalte-cemento

kVp - peak kilovoltage

ltx - leucotoxina distensora citoletal

ltxA - leucotoxina distensora citoletal do promotor A

LPS - lipopolissacarídeo

mA - miliamperes

mg - miligramas

MicroCT- microtomografia computadorizada

min - minutos

ml - mililitros

mm - milimetros

mM - micromolar

MMPs - metaloproteinases da matriz

n - número amostral

nm - nanômentros

N_2 - gás nitrogênio

OMS - Organização Mundial da Saúde

p - valor de p (cálculo de probabilidade)

pb - pares de base

PBS - solução salina tamponada fosfatada

PCR - Reação em cadeia da polimerase

Pg - *Porphyromonas gingivalis*

pg - pictogramas

pH - potencial hidrogeniônico

pmol - picomole

PMSF - Phenylmethylsulfonyl fluoride (fluoreto de fenilmetilsulfonilo)

PTB - pre-term birth (nascimento a pré termo)

qPCR- reação em cadeia da polimerase quantitativa IV-intraveneso

RNA - ácido ribonucleico

rpm - rotação por minuto

Th1 - células T helper tipo 1

Th2 - células T helper tipo 2

Th17 - células T helper tipo 17

TSA - ágar triptone soja

TSB - caldo triptone soja

TSYE - Tryptone Soy Yeast Extract (ágar triptone mais extrato de levedura

UFC - unidade formadora de colônia

Who - World Health Organization

µl - microlitros

µm - micrometro

ºC - graus Celsius

16SrRNA - ácido ribonucleico ribossômico da subunidade 16

Sumário

1 INTRODUÇÃO **21**

2 OBJETIVO **30**

2.1 OBJETIVO GERAL: **30**
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO: **30**

3 MATERIAL E MÉTODO **31**

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL: **31**
3.2 GRUPOS DE ESTUDO **32**
3.3 CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTURA **32**
3.4 ANIMAIS **33**
3.5 INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL POR *P. GINGIVALIS* **34**
3.6 INFECÇÃO POR *A.ACTINOMYCETEMCOMITANS* **35**
3.7 MONITORAMENTO DE ANIMAIS **36**
3.8 EUTANÁSIA **36**
3.9 COLETA DE AMOSTRAS **36**
3.9.1 PARA O ESTUDO DO EFEITO DE P. GINGIVALIS 36
3.9.2 PARA O ESTUDO DO EFEITO DE A. ACTINOMYCETEMCOMITANS: 37
3.10 DETERMINAÇÃO DE *P. GINGIVALIS* E *A. ACTINOMYCETEMCOMITANS* NÍVEIS DE PCR QUANTITATIVO **38**
3.11 MARCADORES INFLAMATÓRIOS **40**
3.12 PREPARO DAS AMOSTRAS **40**
3.13 ELISA **41**
3.14 ANÁLISE DA PERDA DE OSSO ALVEOLAR PARA O MODELO DE *P. GINGIVALIS* **43**
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA **43**

4 RESULTADOS **45**

4.1 EFEITO DA DOENÇA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR *P. GINGIVALIS* **45**
4.1.1 PRESENÇA DE P. GINGIVALIS NA CAVIDADE ORAL, SANGUE, UNIDADE FETO-PLACENTÁRIA E OUTROS SÍTIOS EXTRA-ORAIS. 45
4.1.2 GANHO DE PESO MATERNO 46
4.1.3 NÚMERO DE FETOS 48
4.1.4 PESO FETAL 49
4.1.5 REABSORÇÃO FETAL 51
4.1.6 NÍVEIS DE MEDIADORES INFLAMATÓRIAS NO SORO 52
4.1.7 NÍVEIS DE MEDIADORES INFLAMATÓRIAS NO TECIDO GENGIVAL 52
4.1.8 NÍVEIS DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA PLACENTA 53
4.1.9 PERDA DE OSSO ALVEOLAR 54
4.1.10 CORRELAÇÃO DE SPEARMAN 56
4.2 EFEITO DA DOENÇA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR *A.ACTINOMYCETEMCOMITANS* **58**
4.2.1 PRESENÇA DE A.ACTINOMYCETEMCOMITANS NA UNIDADE FETO-PLACENTÁRIA 58
4.2.2 GANHO DE PESO MATERNO 60
4.2.3 NÍVEIS DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO SORO E PLACENTA 63

5 DISCUSSÃO **66**

6 CONCLUSÃO **83**

REFERÊNCIAS* 85

ANEXOS 99

A - VALORES DAS MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DAS CÓPIAS DO GENE 16SRRNA P.GINGIVALIS ENCONTRADA EM CADA AMOSTRA DE CADA ANIMAL ESTUDADO. 99
B - VALOR DAS PESAGENS DOS ANIMAIS PRENHES AO LONGO DA GESTAÇÃO, JUNTAMENTE COM A MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE CADA ANIMAL DO MODELO EXPERIMENTAL POR *P. GINGIVALIS* 100
C - NÚMERO DE FETOS POR ANIMAL PRENHE DO MODELO EXPERIMENTAL POR *P. GINGIVALIS* 101
D – PESO DE CADA FETO COLETADO POR ANIMAL PRENHE COM MÉDIA POR ANIMAL E DESVIO PADRÃO DO MODELO EXPERIMENTAL POR *P. GINGIVALIS* 102
E - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA DOSAGEM DE CITOCINAS (PG/ML) NO SORO MATERNO DOS GRUPOS TESTE E CONTROLE DO MODELO EXPERIMENTAL POR *P. GINGIVALIS*. 102
F - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA DOSAGEM DE CITOCINAS (PG/ML) NO TECIDO GENGIVAL MATERNO DOS GRUPOS TESTE E CONTROLE DO MODELO EXPERIMENTAL POR *P. GINGIVALIS.* 103
G - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA DOSAGEM DE CITOCINAS (PG/ML) NAS PLACENTAS DOS GRUPOS TESTE E CONTROLE DO MODELO EXPERIMENTAL POR *P. GINGIVALIS* 103
H – MEDIDA ENTRE A JUNÇÃO ESMALTE-CEMENTO E A CRISTA ÓSSEA-ALVEOLAR ENTRE O PRIMEIRO E SEGUNDO MOLAR SUPERIOR DIREITO, DOS ANIMAIS TESTE E CONTROLE E MILÍMETROS DO MODELO EXPERIMENTAL POR *P. GINGIVALIS.* 104
I - VALORES DAS MÉDIAS DAS CÓPIAS DO GENE 16SRRNA DE *A.ACTINOMYCETEMCOMITANS* ENCONTRADA EM CADA AMOSTRA DE CADA ANIMAL ESTUDADO . 104
J – TABELA COM VALORES DOS PESOS DOS ANIMAIS AO LONGO DAS PESAGENS DO MODELO EXPERIMENTAL POR *A.ACTINOMYCETEMCOMITANS.* 105
K – NÚMERO DE FETOS OBTIDOS POR CADA ANIMAL PRENHE DO MODELO EXPERIMENTAL POR A.ACTINOMYCETEMCOMITANS 106
L – PESO DE CADA FETO OBTIDO POR CADA ANIMAL DE AMBOS OS GRUPOS, TESTE E CONTROLE DO MODELO EXPERIMENTAL POR *A.ACTINOMYCETEMCOMITANS.* 107
M - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA DOSAGEM DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS (PG/ML) NO SORO MATERNO DOS GRUPOS TESTE E CONTROLE DO MODELO EXPERIMENTAL POR *A.ACTINOMYCETEMCOMITANS.* 107
N - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA DOSAGEM DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS (PG/ML) NAS PLACENTAS DOS GRUPOS TESTE E CONTROLE DO MODELO EXPERIMENTAL POR *A.ACTINOMYCETEMCOMITANS.* 108
O - ZI MY, LONGO PL, BUENO-SILVA B, MAYER MP. MECHANISMS INVOLVED IN THE ASSOCIATION BETWEEN PERIODONTITIS AND COMPLICATIONS IN PREGNANCY. FRONT PUBLIC HEALTH. 2015; 29;2:290 108

1 Introdução

O nascimento prematuro é uma das principais causas de mortes em recém-nascidos (nas primeiras 4 semanas de vida) (World Health Organazation – WHO, 2013). Bebês com baixo peso ao nascer também apresentam um maior risco adverso no período perinatal, incluindo o aumento da taxa de mortalidade (Figueras et al., 2007). O risco de mortalidade no primeiro mês de vida é 10-40 vezes mais elevados para crianças prematuras comparada com crianças que tiveram período gestacional adequado (Katz et al., 2013). Além disso, os bebês nascidos prematuramente estão em maior risco de desenvolver doenças neurológicas, respiratórias, gastrointestinais e doenças atribuídas à imaturidade do desenvolvimento de múltiplos órgãos (Klimova et al., 2013; Romero et al., 2014). Muitos sobreviventes enfrentam uma vida inteira de deficiências, incluindo dificuldades de aprendizagem além de problemas visuais e auditivas (WHO, 2013).

Uma das complicações mais comuns e perigosas da gravidez é pré-eclâmpsia (PE). Isto é uma desordem multissistêmica associada a elevação da pressão arterial e proteinúria, geralmente após 20 semanas de gestação. PE é primariamente uma disfunção generalizada do endotélio materno, que parece ser parte de uma resposta inflamatória sistêmica exagerada que envolve leucócitos maternos e citocinas pró-inflamatórias. Resumidamente, PE é o resultado do inadequado desenvolvimento de artérias espirais maternas devido à insuficiente invasão do trofoblasto, levando a vasos sanguíneos mais estreitos, o que limita o fornecimento de sangue da mãe para a placenta. Artrose aguda de artérias espiraladas agrava o problema, resultando em hipóxia da placenta. Numa segunda fase, a placenta isquêmica lança micropartículas trofoblásticas para a circulação materna, a qual induz a leucócitos e células endoteliais maternas a produzirem citocinas pró-inflamatórias. Em todo o mundo, PE afeta cerca de 2-10% das mulheres grávidas, é a principal causa de parto prematuro (Raghupathy et al., 2013). Já nas fases iniciais da gestação, células fetais são encontradas na circulação materna. O embrião / feto expressa antígenos paternos, que têm de ser tolerado em toda o período de gestação pela mãe (Zenclussen et al., 2013). Assim, o sistema imunológico materno é ativado, a fim de suprimir a imunidade materna em relação a antígenos fetais, para permitir implantação e desenvolvimento do feto durante a

gestação, mas ainda é capaz de provocar uma resposta imune normal contra infecções (Piccinni et al., 2000; Zenclussen et al., 2013).

Cerca de 50% dos nascimentos prematuros não foram associados a qualquer fator conhecido (Huck et al., 2011), conduzindo à pesquisa de fatores alternativos. Infecções maternas do trato geniturinário podem promover a migração das bactérias vaginais cervicais para o útero (Sobel et al., 2000). Bactérias colonizam a vagina, tal como *Escherichia coli, Gardnerella vaginalis, Streptococcus* do grupo B, e *Mycoplasma hominis* podem ascender a partir do trato genital inferior e recuperados no líquido amniótico (Waldorf et al., 2013) e na placenta (Klimova et al., 2013). Infecções em outras partes do corpo podem também desempenhar um papel importante na indução de nascimentos prematuros, estimular uma resposta imune, devido à passagem de microrganismos e/ou as suas toxinas através da corrente sanguínea para a unidade feto-placentária (Gibbs et al., 2001).

Neste contexto, os tecidos periodontais infectados podem estar associados com a prematuridade atuando como reservatórios de bactérias e seus produtos, que pode difundir para a unidade feto-placenta. Além disso, os mediadores imunológicos em altas concentrações produzidos localmente nos tecidos gengivais ou sistemicamente pode atingir a unidade feto-placentária, resultando em prematuridade e baixo peso ao nascer (Huck et al., 2011; Xiong et al., 2006). Embora alguns aspectos da associação entre a periodontite e complicações na gravidez terem sido elucidadas na literatura, esta relação precisa ser mais bem estudada e caracterizada.

A periodontite é uma doença inflamatória dos tecidos de suporte (gengiva) e dos de sustentação (cemento, ligamento periodontal e osso alveolar) em resposta à microorganismos supra e subgengivais. Ela é dividida em periodontite crônica e periodontite agressiva (Armitage et al., 1999). Periodontite crônica é caracterizada por uma destruição lenta e contínua dos tecidos periodontais (Darveau et al., 2010; Kolenbrander et al., 2010), enquanto que a destruição do ligamento periodontal e osso alveolar é mais rápida e grave na periodontite agressiva (Nibali et al., 2013). Além disso, a periodontite pode afetar mais dentes, periodontite generalizada, ou pode ser restrita a um grupo de dentes, e descrito como periodontite localizada.

A periodontite é iniciada por uma comunidade microbiana disbiótica e não por patógenos selecionados (Hajishengallis, Lamont, 2012). *P. gingivalis* parece promover desequilíbrio de microbiota, mesmo em baixas proporções, e assim é

considerado um agente patogênico pedra angular da periodontite crônica. Esta espécie modula a resposta do hospedeiro a fim de induzir a perda de homeostase e permitir uma colonização microbiana disbiótica (Hajishengallis, Lamont, 2012). *P. gingivalis* não é um agente potente para a indução da inflamação, em vez disso, esta espécie expressa um LPS atípico que antagoniza TLR-4, ao contrário do LPS de outras bactérias gram negativa pró-inflamatória (Darveau et al., 2010). In vivo, o LPS de *P. gingivalis* foi descrito como sendo cerca de 100 vezes mais tóxico que o LPS de outras bactérias (Roberts et al., 1997). Ele se difere bioquimicamente do LPS clássico, derivado das enterobactérias, por possuir heptose e 2-ceto-3-deoxioctonato em sua estrutura (Mansheim et al., 1978). Acredita-se que a maior parte das propriedades biológicas do LPS de *P. gingivalis*, especialmente a endotóxica, seja atribuída à porção A do lipídeo, composta por uma única cadeia de ácido graxo considerado o centro bioativo desta molécula, o lipídeo A é basicamente composto por um único ramo de ácidos graxos com uma longa cadeia de carbono e ausência de um grupo de fosforil na posição 4' da glicosamina (Aida et al., 1995).

Além disso, *P. gingivalis* inibe a produção de IL-8 em tecido periodontal, através da secreção de uma serina fosfatase (SerB) (Darveau et al., 2010), e produz proteases ativas em vários substratos, incluindo as proteínas do sistema complemento. Uma de suas proteases, gingipaina, degrada C3a (Wingrove et al., 1992) e possui uma atividade C5 convertase que age em sinergia com C5a a um aumento do cAMP, resultando na imunossupressão na local da infecção (Wang et al., 2010). Além disso, a sinalização C5aR em sinergia com a ativação TLR2 induzida por *P. gingivalis* é capaz de inibir a resposta antimicrobiana (Wang et al., 2010).

A associação entre *A. actinomycetemcomitans* é mais evidente em indivíduos abrigando as cepas do clone JP2, que pertence ao sorotipo b, considerado um verdadeiro patógeno exógeno, e associado a descendentes hispânicos e africanos (Haubek, 2010; Shaddox et al., 2011). A presença endêmica deste clone foi associado com uma alta prevalência e incidência de periodontite dentro dessas famílias (Bueno et al., 1998), enquanto o papel etiológico de cepas de clones não JP2 para esta doença ainda não está elucidada (Haubek et al., 2001) *A. actinomycetemcomitans* é considerado patógeno pedra angular da periodontite agressiva uma vez que a resposta do hospedeiro modulada pela produção da leucotoxina e CDT, resulta em "paralisia imunológica" permite a proliferação de

certos organismos em locais específicos (Schreiner et al., 2013). A leucotoxina é parte do grupo chamado Repetição de toxina (RTD), família de toxinas de agentes patogênicos gram negativos, que induzem a lise de macrófagos e neutrófilos humanos (Evans et al., 1988). Além disso, a CDT induz a parada do ciclo celular de uma variedade de células, incluindo células epiteliais, fibroblastos e células T (Mayer et al., 1999; Shenker et al., 2000) e é capaz de alterar perfil de citocinas e diminuir a capacidade fagocitária de macrófagos (Ando-Suguimoto et al., 2014). O clone JP2 produz grandes quantidades de leucotoxina (ltx) (Haubek, 2010) e *A.actinomycetemcomitans* sorotipos b e c também estão associadas com o aumento da produção da toxina distensora citoletal (CDT) (Kawamoto et al., 2009).

Classicamente, a periodontite é considerada um tipo misto T-auxiliar Th 1/Th2, com um perfil de citocinas principalmente Th1 na lesão precoce e quando a doença se torna estável, e quando a doença se torna avançada ou progressiva, ocorre um domínio da resposta Th2 (Garlet et al., 2010). As células T CD4+ desempenham um papel central no desenvolvimento de respostas imunes. Inicialmente, dois subtipos de células T CD4+ foram descritos: um subtipo que participa da ativação de células B promovendo a imunidade humoral (Th2), e outro subtipo que amplifica a ativação de macrófagos, promovendo a imunidade celular (Th1). De acordo com a natureza dos sinais de perigo liberados nos sítios inflamatórios, as DCs adquirem um determinado perfil de secreção de citocinas. Esse perfil, dito polarizante, determinará o desenvolvimento da resposta imune efetora. As células Th1 são caracterizadas pela produção de IFN-γ, uma potente citocina ativadora de macrófagos, sendo essenciais no combate a patógenos intracelulares e na indução da produção de anticorpos do subtipo IgG2a pelas células B. A diferenciação Th1 é iniciada através de sinais derivados da ativação do TCR e da via de sinalização de STAT1 (Signal transducer activators of transcription 1). Dentre as citocinas polarizantes capazes de ativar STAT1, pode-se citar IFN do tipo I (IFN α, IFN β) e II (IFN-Y) e IL-27, cujos receptores estão presentes em células T CD4+ virgens (Raposo et al., 2007)

As células Th2 são caracterizadas pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13, sendo responsáveis pelo recrutamento de eosinófilos para os sítios inflamatórios e pela indução da produção de IgG1 e IgE pelas células B. A citocina polarizante IL-4 é responsável por iniciar vias autócrinas positivas e negativas que direcionam o comprometimento com o subtipo Th2 (Raposo et al., 2007)

Periodontite crônica é a forma mais comum que acomete a população, causada principalmente por periodontopatógenos gram-negativos juntamente com a reposta do hospedeiro. Periodontopatógenos conseguem entrar na corrente sanguínea e se disseminar para outras partes do organismo, levando assim fatores de virulência e indução da produção de citocinas pró-inflamatórias nestes diferentes sítios (Horliana et al., 2014).

Não somente a periodontite pode interferir na gravidez, mas também a gravidez pode alterar o progressão de doenças periodontais (DP). As alterações fisiológicas induzidas durante a gravidez podem alterar a resposta inflamatória, amplificando a inflamação gengival. Os níveis aumentados de estrógenos, tais como progesterona, pode causar alterações na resposta imune, a dilatação capilar gengival, e a liberação de exsudato gengival, explicando potencialmente a exacerbação da inflamação gengival durante a gravidez (Yalcin et al., 2002). Gengivite afeta 36-100% das mulheres grávidas (Carrillo-de-Albornoz et al., 2010), que é caracterizada como uma doença inflamatória dos tecidos moles em torno do dente. Em contraste, a periodontite afeta uma proporção menor de mulheres grávidas (~ 30%). No entanto, isso tem consequências mais graves, ou seja a destruição das estruturas de suporte dos dentes que podem resultar na perda do dente. Os estudos mostraram que as condições de stress podem alterar significativamente a resposta imunológica e comportamental do indivíduo.

Em 1996, os resultados de um estudo de caso-controle sugeriram que a doença periodontal materna aumenta em 7 vezes o risco de se ter parto pré-maturo (Offenbacher et al., 1996). Além disso, em mulheres grávidas com alto risco de parto prematuro, patógenos periodontais foram detectadas tanto na bolsa periodontal e no fluido amniótico (Leon et al., 2007), e antigénios de *P. gingivalis* foram detectados nos tecidos placentários de mulheres com corioamnionite (Katz et al., 2009). Além disso, um aumento da susceptibilidade à doença periodontal é conhecido por ser causado por um desequilíbrio entre a resposta do hospedeiro e ação de microorganismos patogênicos. Portanto, é importante considerar o stress como um fator de predisposição para o desenvolvimento da doença periodontal (Ayub et al., 2010). Os parâmetros clínicos tais como sangramento à sondagem e profundidade da bolsa podem aumentar durante a gravidez, sem concomitante aumento no índice de placa, o que diminui após o parto (Gürsoy et al., 2008). Os mecanismos subjacente ao aumento da gravidade da DP durante a gravidez foram associados a

um aumento vascularidade e permeabilidade dos tecidos gengivais, depressão do sistema imunitário, e as mudanças na composição da microbiota supra e subgengivais (Carrillo-de-Albornoz et al., 2010).

Estudos anteriores demonstraram que *Prevotella intermedia* e em menor grau, *P. gingivalis* pode usar progesterona e estradiol, em substituição de vitamina K como fator de crescimento destas espécies (Kornman et al., 1982). Mais recentemente, um aumento na concentração salivar de progesterona a partir do primeiro para o segundo trimestre de gravidez tem sido associada ao aumento dos níveis de *P. gingivalis* (Carrillo-de-Albornoz et al., 2010).

A diversidade microbiana da cavidade oral, ainda não foi avaliada em estudo longitudinal durante todo o período gestacional. No entanto, estudos metagenômicos sobre a microbiota intestinal de mulheres grávidas pode fornecer algumas pistas sobre as mudanças microbianas que ocorrem em superfícies mucosas ao longo da gestação. Análises metagenômicas de fezes de mulheres grávidas em diferentes fases da gestação demonstrou um aumento na abundância de Proteobacteria e Actinobactérias do primeiro para o terceiro semestre, e uma diminuição na riqueza microbiana, que persistiu 1 mês após o parto. Além disso, a mudança microbiana foi seguido por um aumento dos níveis de IFN-γ, IL-2, IL-6 e TNF-α nas fezes, indicando que, apesar das condições anti-inflamatórias na interface placentária, a gestação leva a um baixo grau de inflamação da mucosa intestinal. É importante notar que a composição microbiana determinou o estado inflamatório da superfície mucosa, e não o oposto, uma vez que a transferência experimental da microbiota fecal obtida de mulheres no terceiro trimestre de gestação foi capaz de induzir a inflamação em camundongos receptores (Koren et al., 2012). Estes dados evidenciaram que as mudanças nos níveis de imunidade e / ou hormonais durante a gestação induzem alterações na composição do microbiota, o que leva a um aumento da resposta inflamatória em superfícies mucosas. No seu conjunto, estes dados proporcionam evidências de que alterações fisiológicas associadas com gravidez levam a mudanças nas comunidades microbianas que colonizam superfícies mucosas, o que induzem respostas imunes pró-inflamatórias. Assim, a microbiota já disbiótica em sítios subgengivais de pacientes com DP seria submetida a fatores adicionais que promovem desequilíbrio durante a gravidez, aumentando o seu potencial patogênico para induzir a inflamação gengival.

A gravidez pode ser considerada como um milagre fisiológico já que envolve um processo não natural para o organismo hospedeiro, em que consiste em um evento anormal, propagação de tecido estranho que é acomodado por um período de tempo definido pelo sistema imunológico. Um equilíbrio imunológico é crucial para o implante do óvulo e assim manter a gravidez até o termo. Como o sistema imune materno tem de aceitar um feto semi–alogênico, produto de dois indivíduos de histo-incompatibilidade, Medawar propôs que a mãe precisa estar num estado imunodeprimido (Medawar et al., 1983). Progressos recentes sugerem que o sistema imune materno não só precisa ser suprimido, mas ao mesmo tempo também precisa proteger a mãe e o feto em crescimento das infecções durante a gravidez. Assim, uma gravidez bem sucedida depende da capacidade do sistema imunológico da mãe para se tornar tolerante aos antigénos paternos, bem como a capacidade de rejeitar o feto no caso de infecção por patógenos.

Durante a gravidez há uma resposta Th2 para promover a tolerância deste feto, citocinas produzidas pela resposta Th1 são prejudiciais para a tolerância do feto em concepção, semelhante a aloenxertos em receptores de transplante (Wegmann et al., 1993). No entanto, os dados existentes sugerem que a resposta Th2 durante a gravidez é um modelo simplista e que durante as várias fases da gravidez, as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias são moduladas de forma dinâmica (Chatterjee et al., 2014).

A primeira fase da gestação envolve a implantação de blastocistos no útero, e é predominantemente uma fase pró-inflamatória. Ativação localizada de mediadores inflamatórios ocorre e o sistema imunológico da mãe repara os danos feitos pelo blastocisto invasor. A segunda fase da gravidez é uma fase predominantemente anti-inflamatória. Citocinas da resposta Th2 são produzidas na segunda fase da gravidez, que podem agir sistemicamente ou localmente na interface materno-fetal. A última fase da gravidez é o parto, o qual provoca a contração do útero, o meio pró-nflamatória é predominante (Chatterjee et al., 2014).

As interações entre células imunes maternas e a placenta são de interesse substancial por conta das inúmeras complicações durante a gravidez, como aborto recorrente, vilosite de etiologia desconhecida e pré-eclâmpsia podem surgir devido a adaptação inadequada do sistema imunitário materno. Durante a gravidez normal, detritos de trofoblastos são derramados a partir da placenta para o sangue materno

em grandes quantidades. Estes detritos de trofoblastos são rapidamente eliminados da circulação materna (Abumaree et al., 2012). Fagocitose de detritos dos trofoblastos induzem a secreção de citocinas anti-inflamatórias, IL-10, IL-6 e IL-1Ra e diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias de IL-1β, IL12p70 e IL-8 por macrófagos, indicando que durante a gestação ocorre um direcionamento da resposta imune para a tolerância e não para a inflamação. A inflamação é rigidamente controlada durante todas as fases da gravidez, porém uma resposta inflamatória excessiva e persistente materna está associada a resultados adversos da gravidez.

A Infecção materna pode contribuir com Inflamação sistêmica e resultar em alterações gestacionais (Redman et al., 2005). Infecção causadas por bactérias, vírus e parasitas, que normalmente induzem a uma resposta Th1 podem impactar o desenvolvimento da placenta e sobrevivência fetal (Infante-Duarte et al., 1999).

A cascata inflamatória desencadeada por infecções exerce um papel central na patogênese associada com o nascimento prematuro e lesão fetal. Produtos bacterianos estimulam a produção de citocinas por tecidos placentários, como córion, decídua, e trofoblastos (Guleria et al., 2000). Durante a infecção, as citocinas produzidas pelas membranas fetais em resposta aos agentes patogênicos bacterianos têm um papel duplo: para controlar o crescimento de agentes bacterianos e, ao mesmo tempo, para agravar o processo inflamatório, o que pode levar à lesão fetal e trabalho de parto prematuro (Klimova et al., 2013). Para uma revisão sobre a relação entre os resultados adversos da gestação e periodontite, ver uma revisão recentemente publicado (Zi et al., 2015) (Anexo O).

O nosso grupo demonstrou que a infecção experimental de *P. gingivalis* subcutâneamente em ratos levou à redução ganho de peso materno, produção de citocinas pró-inflamatórias em placenta e soro materno, além da detecção do microrganismo na unidade fetal placentária. Além disso, no mesmo estudo constatou-se que a infecção no meio do período gestacional causou mais consequências para a desenvolvimento fetal com a indução de citocinas pró-inflamatórias nos compartimentos fetais do que a infecção antes de gestação ou no final do período de gestação (Michelin et al., 2012).

No entanto, a periodontite não é caracterizada por uma infecção aguda como promovido por injeção de *P. gingivalis* em tecidos subcutâneos, e consideramos que um modelo experimental crônico de periodontite induzida por *P. gingivalis* iria

mimetizar melhor os efeitos da periodontite do que um modelo de infecção aguda. O modelo de periodontite induzida por *P. gingivalis* foi introduzido em nosso laboratório por um estudo piloto (Zi MYH. bolsa IC FAPESP 2012 / 17734-4). No entanto, o modelo experimental de periodontite induzida por *A.actinomycetemcomitans* não foi capaz de induzir infecção de longa duração por este organismo na cavidade oral de camundongos, embora seja induzida a produção de citocinas inflamatórias nos tecidos gengivais, e resposta de IgG contra *A.actinomycetemcomitans* no soro (Neves N. Bolsa IC FAPESP 2013/060367). Assim, para investigar o efeito da infecção com *A.actinomycetemcomitans* durante a gestação, a inoculação intravenosa do organismo foi utilizado.

2 Objetivo

2.1 Objetivo geral:

Avaliar os efeitos da infecção com *P. gingivalis* e com *A.actinomycetemcomitans* na prenhez.

2.2 Objetivo específico:

Para determinar os efeitos da infecção oral com *P. gingivalis* na prenhez foram analisados:

- Presença de *P. gingivalis* na cavidade oral, sangue, soro, fígado, intestino, fezes e unidade feto-placentária
- Ganho de peso materno, número de fetos, peso fetal e reabsorção fetal;
- Níveis de citocinas inflamatórias no soro, tecido gengival e placenta;
- Perda de osso alveolar

Para determinar os efeitos da infecção por *A.actinomycetemcomitans* na prenhez foram analisados:

- Presença de *A.actinomycetemcomitans* no sangue, soro e unidade feto-placentária;
- Ganho de peso materno, número de fetos, peso fetal e reabsorção fetal;
- Níveis de citocinas inflamatórias no soro e placenta.

3 Material e Método

3.1 Desenho experimental:

Este estudo determinou o efeito da infecção pelos patógenos *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* na gestação.

Foi induzida periodontite experimental pela inoculação com *P. gingivalis* e após 21 dias após o primeiro dia de inoculação, os animais foram deixados para acasalar.

Devido a ausência de um modelo experimental eficiente para indução de periodontite pela inoculação oral por *A.actinomycetemcomitans* que resulte em infecção persistente, como demonstrado em estudo piloto (Neves et al., 2013 dados não publicados), a infecção por *A.actinomycetemcomitans* em camundongos foi obtida, após o acasalamento, por meio de injeções intravenosas em dias intercalados durante todo o período de gestação.

Ao final do período de prenhez, em ambos os estudos, no 16° dia após o acasalamento, os animais foram sacrificados. Os efeitos da infecção por *P. gingivalis* ou *A.actinomycetemcomitans* foram determinados avaliando-se o padrão gestacional (peso do feto, ganho de peso materno e a presença de reabsorção fetal), níveis de mediadores inflamatórios, e presença do patógeno no sangue, soro, e unidade feto-placentária dos grupos infectados e estes comparados aos grupos controle, não infectados, que receberam apenas o veículo, volume e periodicidade que foi realizada a inoculação do patógeno no grupo infectado.

Nos grupos relacionados á infecção oral por *P. gingivalis*, a perda óssea alveolar foi avaliada por MicroCT e a presença do agente infeccioso foi determinada na cavidade oral (amostras de biofilme e tecido gengival) e em amostras de sangue, soro, fígado, intestino, fezes, feto, placenta e líquido amniótico por qPCR. Para detecção de *A.actinomycetemcomitans* foram realizadas análises em amostras de soro, sangue, placenta, feto e líquido amniótico.

Os níveis de marcadores inflamatórios foram determinados em amostras de soro materno, placenta, tecido gengival para animais infectados dos grupos teste de *P. gingivalis* e seu controle, enquanto que para os animais infectados com

A.actinomycetemcomitans e seu grupo controle, os marcadores inflamatórios foram analisados em amostras de soro materno e placenta.

3.2 Grupos de estudo

a. Efeitos da infecção oral experimental por *P. gingivalis* durante a gestação

O estudo foi composto por dois grupos, formado por 9 camundongos do grupo teste e 5 camundongos do grupo controle, que receberam inoculações via oral com *P. gingivalis* (Grupo teste: infectado) ou apenas com o veículo (Grupo controle: não infectado). Após 21 dias da primeira inoculação, os animais acasalaram, e após a confirmação da prenhez, os animais foram acompanhados durante o período gestacional, e sacrificados no 16º dia de prenhez.

b. Efeito da infecção por *A. actinomycetemcomitans* durante a gestação

O estudo compreendeu dois grupos de animais, 6 animais teste e 5 animais controle, com prenhez confirmada, que foram inoculados por injeção IV com *A.actinomycetemcomitans* (Grupo teste, infectado) ou com o veículo (Grupo controle: não infectado)

3.3 Cepas bacterianas e condições de cultura

Foi utilizada a amostra de referência *P. gingivalis* HW24 D-1, classificada como genótipo *fimA* IV (Amano et al., 2000), não capsulada e fimbriada, que possui altas taxas de adesão às células epiteliais, o que poderia facilitar sua adesão na cavidade oral do camundongo e o estabelecimento da doença.

Alíquotas, estocadas em 20% de glicerol em freezer -80 °C foram descongeladas e semeadas em placa com ágar triptone soja (TSA) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro, hemina (5 mg/ml) e menadione (10 mg/ml). As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose com 85% N_2, 5% CO_2 e 10% H_2 por 10 dias a 37 ºC.

Após o período de incubação, as colônias foram transferidas para 3 ml de caldo triptone soja (TSB) acrescido de hemina (5 mg/ml) e menadione (10 mg/ml)

seguindo-se incubação por 48 horas. Após diluição 1:10, as culturas foram incubadas por 24 horas alcançando assim a fase exponencial de crescimento. Após este período, a absorbância foi ajustada a DO_{560nm} ~ 0,5 e determinado o número de UFC após inoculação e desenvolvimento das colônias em meio sólido.

Uma amostra de *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b, pertencente ao clone JP2 (determinado pela deleção de 560 pb na região promotora de *ltx*), fimbriada foi utilizada. Essa amostra foi obtida de paciente brasileiro com periodontite agressiva, em projeto em colaboração com a Profª Drª Luciana Saraiva (FOUSP). A amostra foi cultivada em placas com ágar triptone acrescido de extrato de levedura, soro, bacitracina e vancomicina (Slots et al., 1982) e, após um único repique, as colônias foram transferidas para glicerol a 20% e estocadas a -80 °C.

Alíquotas do estoque congelado foram inoculadas em placas de ágar triptone (TSA) (Acumedia Incorporated, Lansing, EUA) acrescido de 0,6% de extrato de levedura (Amershan Life Science, Cleveland, EUA) (Ágar TSYE), seguindo-se incubação por 48 horas a 37 ºC em microaerofilia (5% de CO_2) (Shel Lab TC 2123, Oregon, EUA). Após o desenvolvimento das colônias, três a cinco colônias rugosas foram inoculadas em caldo BHI e incubadas por três dias a 37 ºC sob microaerofilia. após crescimento de 4 horas foi realizado ajuste, determinada por espectofotometria a 495 nm, OD=0,495 correspondendo a aproximadamente a 1 x 10^9 UFC/ml.

3.4 Animais

Obtivemos 25 animais da linhagem C57BL6 com 4-5 semanas de idade, obtidos a partir do Instituto de Ciências Biomédicas, foram mantidos em gaiola com filtros micro isoladoras acondicionadas em prateleiras com ventilação e com temperatura controlada no Instituto de Ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, e receberam água e ração Nuvulab CR-1 (Quimtia, Colombo, PR, Brasil) *ad libitum*. Após a obtenção dos animais, estes passaram por um período de 5 dias para adaptação no novo biotério. Os animais foram pesados inicialmente e depois do período de adaptação.

Usando a mesma linhagem de camundongos foi utilizado na razão de 1 macho para 3 fêmeas para o acasalamento. Grupos de animais foram mantidos

separadamente. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética, Comissão em Experimentação Animal do ICB USP, cujo número de protocolo listados registrada sob n° 06 sobre pgs. 15 do livro 03, aprovação do Comitê de Ética.

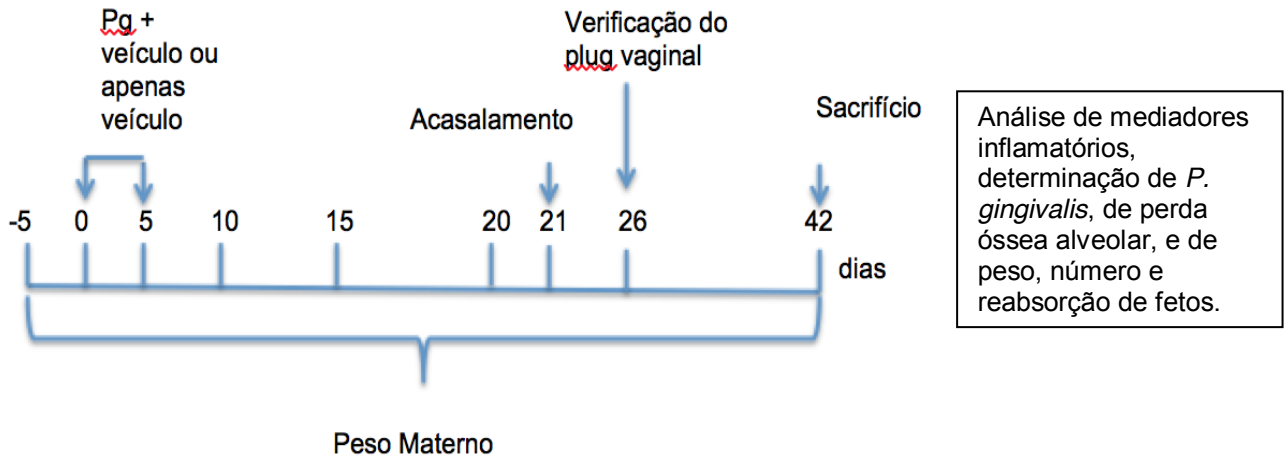
3.5 Indução da doença periodontal experimental por *P. gingivalis*

A doença periodontal experimental foi induzida de acordo com Holzhausen et al. (2006), com algumas modificações (introduzidas após um teste piloto). Alíquotas de culturas bacterianas, obtidas como descrito no item 3.3, foram centrifugadas e o precipitado foi suspenso em gel de carboximetilcelulose a 2%. Cada animal do grupo teste foi inoculado com 100 µl de gel contendo 1 x 10^8 UFC de *P. gingivalis* HW24 D-1 por via oral com o auxílio de uma agulha de gavagem.

Imediatamente após a inoculação os animais foram mantidos em jejum de água e comida por 1 hora para favorecer a permanência da bactéria na cavidade bucal. O procedimento de inoculação foi repetido durante 5 dias consecutivos, duas vezes por dia. Os animais do grupo controle foram inoculados apenas com o veículo, no mesmo volume, forma e periodicidade que os animais do grupo teste.

Dezesseis dias após o último dia de inoculação, os animais machos foram postos nas gaiolas das fêmeas para cruzamento, em razão 3 para 1. A determinação da prenhez dos animais foi realizada pela verificação do plug vaginal, (em um intervalo médio de 5 dias). A seguir, os machos foram retirados e as fêmeas acompanhadas por 16 dias a partir da verificação do plug e então sacrificadas.

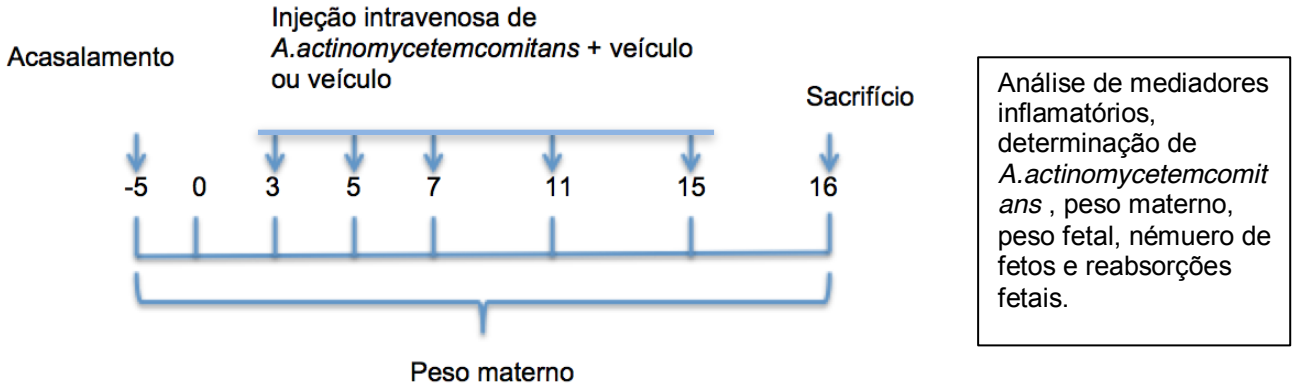
Figura 1 – Delineamento do estudo experimental em camundongos C57BL6 de avaliação do efeito da doença periodontal induzida por *P. gingivalis* sobre a prenhez.



3.6 Infecção por *A.actinomycetemcomitans*

A infecção por *A.atinomycetemcomitans* foi realizada como descrito por Tuomainen et al.,(2008). Os animais foram mantidos com os machos na proporção 3:1 para acasalamento. Após a determinação do plug vaginal, cada animal do grupo teste foi inoculado via IV, pela veia caudal, com 50 µl de suspensão de *A. actinomycetemcomitans* clone JP2 fimbriado contendo 10^9 UFC em PBS/ camundongo. Esta inoculação foi realizada no 3º, 7º, 11º e 15º dias de prenhez. Os animais do grupo controle foram inoculados apenas com o veículo (50 µl PBS /camundongo) nos mesmos períodos que os animais do grupo teste. No 16º dia após confirmação do plug vaginal, os animais foram sacrificados e amostras de sangue, soro, fetos, placenta e líquido amniótico foram recolhidos para a detecção de *A.actinomycetemcomitans* e análise de citocinas.

Figura 2 – Delineamento do estudo experimental em camundongos C57BL6 de avaliação do efeito da infecção por *A.actinomycetemcomitans* sobre a prenhez.



3.7 Monitoramento de animais

Em ambos os estudos, antes da primeira inoculação, todos os animais foram pesados e o peso foi monitorado, fêmeas foram pesadas antes do acasalamento e a cada 5 dias durante a gestação. Além disso, os animais foram monitorados para determinar alterações na mobilidade ou presença de lesões cutâneas devido a infecção.

3.8 Eutanásia

Depois de 16 dias após a confirmação do plug vaginal (um dia menos do que uma gestação normal), os animais foram anestesiados com uma combinação de ketamina (Dopalen10% -Vertbrands Laboratory - Brasil) e xilazina (2% Ansedan - Brasil Laboratório Vertbrands-), o sangue foi obtido e, em seguida, sacrificados em câmara de CO_2 .

3.9 Coleta de amostras

3.9.1 Para o estudo do efeito de P. gingivalis

A coleta de fezes foi realizada diretamente das gaiolas dos animais infectados e não infectados. As amostras de fezes foram armazenadas em tampão Tris-EDTA (pH 7,4). A coleta de sangue foi realizada através de punção do plexo orbital e a amostra dividida em três partes. Parte foi armazenada com 25 µl de EDTA e utilizada para a detecção de *P. gingivalis* em sangue. O restante do sangue foi

centrifugado para obter soro e este foi dividido em duas partes e utilizado para determinar o perfil de mediadores inflamatórios e a presença de bactérias por qPCR.

Para a determinação de níveis de agente patogênico, o tecido gengival foi removido na região dos molares superiores do lado esquerdo; e foram coletados também fígado e intestino. Os fetos foram pesados e foram colocados em 500 µl de tampão Tris-EDTA (pH 7,4) . As placentas foram recolhidas, divididas ao meio, uma porção foi colocada em 50 µl de tampão Tris-EDTA (pH 7,4) e a outra metade em solução para análise de citocinas descrito a seguir. Foram coletados 3 fetos de cada animal na medida do possível, mas coletado no máximo 3 fetos para análise de presença do patógeno. O líquido amniótico foi obtido por punção com uma seringa e colocada num microtubo, formando um *pool* de líquido amniótico de todos os fetos do mesmo animal. Para determinação dos níveis do patógeno no biofilme, a mandíbula foi removida, colocada num tubo contendo 1 ml de PBS e submetida a agitação em banho de ultrassom durante 30 segundos. Em seguida, a mandíbula foi removida e as células precipitadas por centrifugação e ressuspensas em tampão Tris-EDTA (pH 7,4).

Para determinar o perfil de citocinas, o tecido gengival da região de molares superiores do lado esquerdo foi retirado e colocado em tampão de lise [PBS acrescido de 0,05% de Tween 20, 1 mM de PMSF (Sigma P7626) e cocktail inibidor de proteases (Sigma P8340) diluído 1: 100]. Metade de cada amostra de placenta também foi armazenada neste mesmo tampão. Todas as amostras foram armazenadas a -80 °C até ao momento da utilização.

3.9.2 Para o estudo do efeito de A. actinomycetemcomitans:

Para o estudo com *A. actinomycetemcomitans* optou-se por coletar sangue, soro, placenta, feto e líquido amniótico. A coleta de sangue foi realizada através de punção do plexo orbital e a amostra dividida em três partes. Parte foi armazenada com 25 µl de EDTA e utilizada para a detecção de *A. actinomycetemcomitans* em sangue. O restante do sangue foi centrifugado para obter soro e este foi dividido em duas partes e utilizado para determinar o perfil de mediadores inflamatórios e a presença de bactérias por qPCR.

As placentas foram recolhidas, divididas ao meio, uma porção foi colocada em 50 µl de tampão Tris-EDTA (pH 7,4) e a outra metade em solução para análise

de citocinas descrito a seguir. Foram coletados 3 fetos de cada animal na medida do possível, mas coletado no máximo 3 fetos para análise de presença do patógeno e foram colocados em 500 µl de tampão Tris-EDTA (pH 7,4). O líquido amniótico foi obtido por punção com uma seringa e colocada num microtubo, formando um *pool* de líquido amniótico de todos os fetos do mesmo animal.

Para determinar o perfil de citocinas, metade de cada amostra das placentas foram colocado em tampão de lise [PBS acrescido de 0,05% de Tween 20, 1 mM de PMSF (Sigma P7626) e cocktail inibidor de proteases (Sigma P8340) diluído 1: 100]. Todas as amostras foram armazenadas a -80 °C até ao momento da utilização.

3.10 Determinação de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* níveis de PCR quantitativo

As amostras de biofilme, sangue, tecido gengival, fetos, placenta, intestino, fígado e fezes dos grupo teste e controle do estudo com *P. gingivalis* foram submetidas a extração de DNA, utilizando o kit DNA and RNA Purification Kit ™ (Epicentre® Biotechnologies, Madison WI, EUA). O mesmo procedimento foi empregado para as amostras da placenta e fetos dos animais dos grupos teste e controle do estudo com *A.actinomycetemcomitans*.

Para amostras de tecido, Proteinase K foi adicionada (2 µl por unidade de tecido) e a mistura foi incubada a 65 °C com agitação por um período *overnight*. Após a extração, a quantidade e a qualidade do DNA extraído foi determinada pela medida da absorbância em comprimento de onda de 260 e 280 nm, em espectrofotômetro ND-1000 V 3.5.2 Nanodrop® (Nanodrop Techologies, ND-100, Wilington, DE, EUA).

Após a obtenção do DNA, a detecção dos patógenos foi realizada por PCR em tempo real, usando iniciadores complementares ao gene *16S rRNA* de *P. gingivalis* (Amano et al., 2000) ou ao gene *16S rRNA* de *A. actinomycetemcomitans* (Rudney et al., 2003).

A análise quantitativa por PCR em tempo real foi realizada utilizando o Easy Quantimix SYG kit (Biotools, Madrid, Espanha) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante no equipamento Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Foram usados 10 µl de SYBR Green, 0,5 µl de DNA molde, 200 mM de cada iniciador, num volume total de 20 µl.

Para *P. gingivalis*, as reações foram realizadas com pré-incubação a 95 ºC por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 ºC por 10 segundos, anelamento a 60 ºC por 1 minuto e tempo de extensão a 95 ºC por 15 segundos.

Para *A. actinomycetemcomitans* a reação de amplificação foi realizada em um volume final de 20 µl, 1 µl de DNA, 0,5 µl de *primers* específicos (25 pmol/µl) para o *16SrRNA* de *A. actinomycetemcomitans (*Forward: 5´ATT GGG GTT TAG CCC TGG T3´ (Tran & Rudney et al., 1996) e Reverse: 5´ATT GGG GTT TAG CCC TGG T3´ (Wahlfors et al., 1995)], (Life Technologies) e 10 µl de Syber Green Select Master Mix (Applied Byosistems). A quantidade de DNA molde de cada amostra testada foi 50 ng/ml. As reações foram realizadas com desnaturação inicial de 95º por 10 minutos, seguindo-se 40 ciclos de 95 ºC /15 segundos, 65 ºC /1 minuto e 81 ºC /10 segundos, seguido de duas etapas de 95 ºC/15 segundos e 65 ºC /1 minuto. E uma etapa final de 0,5 ºC - 95 ºC/15 segundos.

Após a reação, foi realizada a curva de dissociação para verificar a especificidade dos amplicons. Para *A. actinomycetemcomitans* foram realizados 30 ciclos de 30 segundos com queda de 1 ºC por ciclo iniciando-se em 95 ºC até atingir a temperatura de 76 ºC. Para *P. gingivalis* foram realizados 30 ciclos de 30 segundos com queda de 0,6 ºC por ciclo iniciando-se em 95 ºC até atingir a temperatura de 70 ºC (van der Ploeg et al., 2004).

A fluorescência foi detectada após cada ciclo e representada em um gráfico utilizando o software Step One Plus Real- Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA).

O número de cópias de cada gene foi calculado com base na curva padrão obtida por diluição seriada de plasmídios contendo o gene *16S rRNA* de cada uma das espécies, obtidos anteriormente neste laboratório (Ando- Suguimoto et al., 2014; Teixeira et al., 2009). A curva padrão foi realizada em triplicata, com diluições entre 10^2 e 10^7 Cópias em cada ensaio. O número de células de cada uma das espécies foi calculado com base no número de cópias de *16S rRNA* por cromossomo de cada espécie. O gene *16S rRNA* está presente em 4 cópias no genoma de *P. gingivalis* e em 6 cópias no genoma de *A. actinomycetemcomitans.* Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Tabela 1 - Seqüências dos iniciadores utilizados para determinação de *P. gingivalis* e de *A. actinomycetemcomitans* e tamanho do produto esperado (Amano et al., 2000; Rudney et al., 2003).

Gene	Iniciadores	Seqüência de nucleotídeos	Produto (pb)
P. gingivalis 16S rRNA	Pg rRNAf Pg rRNAr	5´TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA ACC 3´ 5´ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC 3´	197
A. actinomycetemcomitans 16S rRNA	Aa rRNAf Aa rRNAr	5´ ATT GGG GTT TAG CCC TGGT 3` 5` ACT GAA CCT GAC CGT ACA GGC ACA AAC CCA TCT CTGA 3`	530

3.11 Marcadores inflamatórios

As amostras de soro, placenta e tecido gengival dos animais infectados com *P. gingivalis* foram analisadas para os níveis destas citocinas: IL-1-β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17α, TNF-α, GM-CSF, IFN-γ, IL-12 p40, IL-12p70 foram avaliados por ELISA destas amostras por Luminex®.

As amostras de soro e placenta dos animais infectados com *A. Actinomycetemcomitans* foram analisadas para os níveis destas citocinas: IFN-γ, IL-4, IL-6 e TNF-α (BD OptEIA ELISA kit II, BD Biosciences, New Jersey, EUA)

3.12 Preparo das amostras

Para as amostras de infectadas com *P. gingivalis* a dosagem das citocinas IL-1-β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17α, TNF-α, GM-CSF, INF-γ, IL-12 p70, IL-12p40 foram realizadas em 23 placentas, 9 tecidos gengivais e 9 amostras de soro dos animais do grupo teste e 12 placentas, 5 tecidos gengivais e 5 amostras de soro para os animais controle para infecção com *P. gingivalis.*

Para as amostras de infectadas com *A. Actinomycetemcomitans* a dosagem das citocinas IFN-γ, IL-4, IL-6, TNF-α e IL-17α foram realizadas em 14 placentas e 6

amostras de soro do grupo teste e 13 amostras de placenta e 5 amostras de soro dos animais controle para o grupo infectado com *A. Actinomycetemcomitans.*

As amostras de placenta obtidas como descrito acima (item 3.9), imediatamente após a cesariana foram mantidas em gelo, maceradas no tampão acrescido dos inibidores de protease (P8340, Sigma-Aldrich MO, EUA) e 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich MO, EUA), com uso de maceradores manuais para microtubos e posteriormente centrifugadas em 13000 rpm por 10 minutos . Tanto as amostras de soro, como o sobrenadante do macerado de placenta, foram congelados imediatamente e transferidos para freezer -80 ^{o}C até o momento da manipulação.

3.13 ELISA

Para amostras de animais infectados por *P. gingivalis,* foi utilizado o kit Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Assay das seguintes citocinas, IL-1-β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17α, TNF-α, GM-CSF, IFN-γ, IL-12 p70, IL-12p40 (Bio- Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA)

Grânulos de propriedades espectrais são conjugados com anticorpos de captura específicos para a proteína adicionado juntamente com as amostras (incluindo os padrões de concentração conhecida de proteína, controle e amostras de ensaio), nas cavidades da microplaca de um filtro de fundo. Proteína alvo se liga ao anticorpo de captura ao longo de uma incubação de duas horas. Após lavagem dos grânulos de propriedades espectrais e as proteínas específicas , anticorpos detectores biotinilados são adicionados e incubados com os grânulos de propriedades espectrais durante 1 hora. Em seguida, o excesso de anticorpos detectores biotiniladas são removidas, e conjugada com proteína de estreptavidina fluorescente, R-ficoeritrina (SAV-R-PE) é adicionada e incubada durante 30 minutos. SAV-PE-R liga-se a anticorpos detectores biotinilados. Depois da lavagem, em que os componentes que não foram ligados a SAV-EPR são removidos, os grânulos são analisadas com um sistema de detecção de Luminex®. De monitoramento das propriedades espectrais dos grânulos e a quantidade de associação a R-ficoeritrina (RPE) são analisados por fluorescência, pode ser determinada a concentração de uma ou mais proteínas.

A concentração de cada analítica foi expressa em pg/mL. As amostras com quantificação limite foram registrados como "zero" e amostras acima da curva padrão limite de quantificação foram gravadas com um valor igual ou maior da curva. As amostras eram avaliadas em valores em unicata, porém, neste sistema, cada poço possui 50 beads, ou seja, 50 marcadores de leitura, então apenas um poço foi utilizado para cada amostra.

Placenta e tecidos gengivais do grupo infectado com *P. gingivalis* também foram analisadas por Luminex®

Para os animais de *A. actinomycetemcomitans*, amostras de soro e placenta foram analisados por kits de ELISA convencionais da (OptEIA ELISA kit II, BD Biosciences, New Jersey, EUA).

Para dosagem de IFN-γ, IL-4, IL-6 e TNF-α. Foram adicionados 100 µl de solução de anticorpo de captura na concentração de 0,4 µg/ml por poço em placas de 96 poços (Costar, EUA). As placas foram seladas e incubadas a 4 ºC por 16 horas. Após este período, as placas foram lavadas por 3 vezes com solução de PBS/Tween 20 a 0,1%. Em seguida, foram adicionados 200 µl de solução bloqueadora (Assay Diluent com PBS com 10% de SFB Hyclone) a cada poço, seguindo-se incubação por 1 hora a temperatura ambiente e lavagem por 3 vezes com solução de PBS/Tween 20 a 0,1%. As amostras foram adicionadas em volume de 100 µl em triplicata, seguindo-se incubação por 2 horas a temperatura ambiente. Após lavagem 5 vezes com solução de PBS/Tween 20 a 0,1%, foi adicionado o anticorpo de detecção a uma concentração final de 0.4 µg/ml em um volume de 100 µl/poço, seguindo-se incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, foi adicionada uma solução de conjugado substrate solution em um volume de 100 µl/poço, seguindo-se incubação por 30 minutos sob proteção da luz. Após esse período, adicionado 50µl de Stop solution. A leitura da densidade óptica foi realizada em comprimento de onda de 450 nm em leitor de ELISA (BioRad- Modelo 680, Hercules, California, EUA).

3.14 Análise da perda de osso alveolar para o modelo de *P. gingivalis*

Análise da perda do osso maxilar foi realizado por microtomografia (MicroCT) em equipamento multiusuário na FO Araraquara UNESP (unidade adquirida pela FAPESP processo 2009 / 54080-0).

Depois de sacrificar os animais, as amostras de maxila dos camundongos de cada grupo controle e teste foram cuidadosamente retirados , fixadas em paraformaldeído a 4%. Uma semana antes da análise as amostras foram transferidas e armazenados em etanol a 70% à temperatura ambiente até a análise por microCT.

As maxilas dos camundongos foram digitalizados usando o scanner para animais microCT (µCT SkyScan 1176; SkyScan, Kontich, Bélgica). O gerador de raio-X foi operado a 50 kVp e 500 mA de corrente com um filtro de 0,5 milímetros, de alumínio com uma resolução de imagem de 12,45 µm. Maxilas do grupo teste e controle foram scaneadas no mesmo período para permitir a comparação entre os grupos experimentais. Cada digitalização levou aproximadamente 20 minutos para serem concluídos. As imagens foram então reconstruídos com software específico (NRecon 1.6.1.5; Skyscan, Kontich, Bélgica) em todas as três dimensões espaciais, e, em seguida, todas as imagens foram re-oreintadas e salvas em cortes sagital (2000 × 1336), utilizando software específico (DataViewer versão 1.5.0.2.; SkyScan, Kontich, Bélgica). As medidas lineares foram determinados a partir da junção esmalte-cemento (JEC) até a ponta da crista óssea alveolar a região distal do primeiro molar e na região mesial do segundo molar. Os valores foram obtidos, usou a estatística pacote GraphPad Prism Versão 6.0.

3.15 Análise estatística

Os níveis de citocinas e os níveis de colonização da cavidade oral e dos diferente sítios extra-orais por *P. gingivalis* nos diferentes grupos foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney, se normal distribuição de dados. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

O peso materno inicial e final foi comparado, bem como do peso fetal dos grupos teste e controle foram comparados por teste de Mann Wittney, se a

distribuição normal dos dados. Os valores de P foram consideradas <0,05 estatisticamente significativa.

Utilizamos a correlação de Spearman para descrever a relação entre as diversas variáveis relacionadas ao padrão de prenhez como peso e número de fetos, % de ganho de peso materno e ganho de peso materno com mediadores inflamatórios. Valores de Correlação de Spearman entre variáveis relacionadas a alterações no padrão de prenhez em camundongos dos grupos teste (infectado com *P. gingivalis e A. actinomycetemcomitans*) e controle (não infectado) em amostras obtidas no 16º dia da prenhez. Os valores de p foram considerados significante quando p<0,05.

4 Resultados

4.1 Efeito da doença experimental induzida por *P. gingivalis*

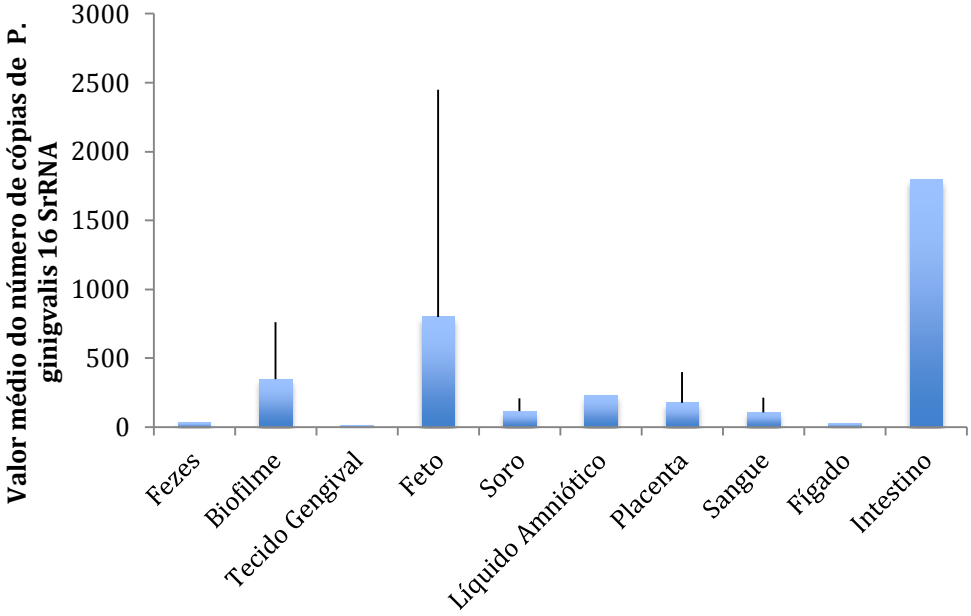
Para realização deste trabalho, inicialmente, foi realizado ensaio piloto para estabelecer a concentração de *P. gingivalis* adequada para desenvolvimento de infecção oral em camundongos, como descrito anteriormente (item 3.5 A indução da doença periodontal experimental por *P. gingivalis*). Embora no estudo piloto tenhamos realizado a inoculação em apenas 3 camundongos, conseguimos induzir a infecção nos camundongos, pois foi possível detectar através de qPCR o patógeno em sangue, soro, fezes, placenta, liquido amniótico e em fetos. Através da análise por micro-tomografia computadorizada pudemos determinar que houve perda de volume ósseo no grupo infectado, comparado ao grupo controle (Zi MY. bolsa IC FAPESP 2012/17734-4).

No presente estudo, foram comparados os resultados do grupo experimental (n=9) inoculado com *P. gingivalis*, com seu respectivo controle (n=5), inoculado com o veículo conforme apresentado a seguir.

4.1.1 Presença de P. gingivalis na cavidade oral, sangue, unidade feto-placentária e outros sítios extra-orais.

Amostras da unidade feto-placentária (placenta, feto e líquido amniótico), fezes, intestino, fígado, soro, sangue, tecido gengival e biofilme dental foram avaliadas quanto a presença de DNA de *P. gingivalis*. O DNA de *P. gingivalis* não foi detectado em nenhuma amostra de animais pertencentes aos grupos controles. DNA de P. gingivalis foi detectado em amostras de sangue (5/9), soro (3/9), tecido gengival (1/9), biofilme (4/9), intestino (1/9), fezes (1/9), fígado (4/9), fetos (8/27), placentas (9/27) e líquido amniótico (1/9) dos animais do grupo teste. A figura 3 mostra os valores médios e desvio padrão do numero de cópias do gene *16SrRNA* de *P. gingivalis* nas amostras do grupo teste. A quantidade de cópias do gene *16SrRNA* de *P.gingivalis* encontradas em cada amostra de cada animal estudado está detalhada no anexo A.

Figura 3 - Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão do número de cópias do gene *16SrRNA* de *P.gingivalis* nas amostras do grupo teste, após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez.

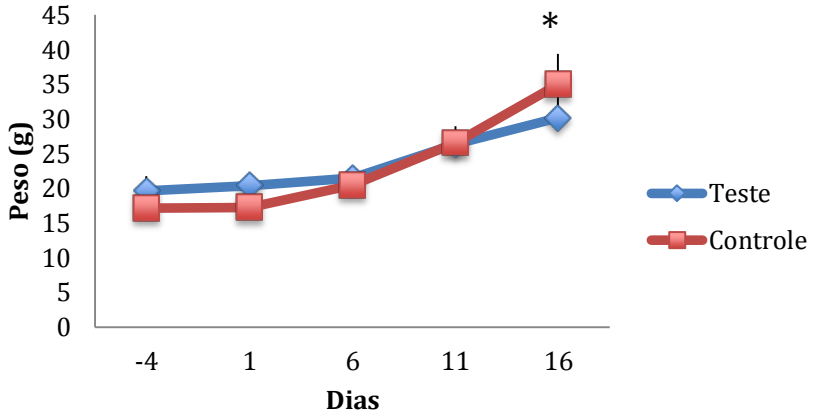


4.1.2 Ganho de peso materno

O peso dos camundongos foram anotados a cada 5 dias, durante todo o período experimental. A infecção experimental não provocou perda de peso nos camundongos do grupo teste, em relação ao controle (dados não apresentados). No primeiro dia em que os animais foram colocados para acasalamento, o peso médio dos animais do grupo teste foi de 19,68 g ± 2,078 enquanto do grupo controle foi de 17,12 g ± 3,69. Por outro lado, verificamos que os camundongos infectados apresentaram menor ganho de peso ao final da gestação (16º dia) em relação ao peso inicial quando comparadas com o grupo controle. Esta diferença de ganho de peso materno entre os grupos experimentais e respectivos controles foi estatisticamente significante (Mann Wittney, $p<0,05$). Na figura 4 estão apresentados os valores de média e desvio padrão do peso dos camundongos ao longo da gestação. Na figura 5 estão apresentados a média e o desvio padrão do ganho do peso materno, os valores foram estatisticamente significantes (Mann Wittney, $p<0,05$). Na figura 6 estão apresentados a média e desvio padrão da porcentagem do ganho de peso materno, os valores foram estatisticamente significantes (Mann

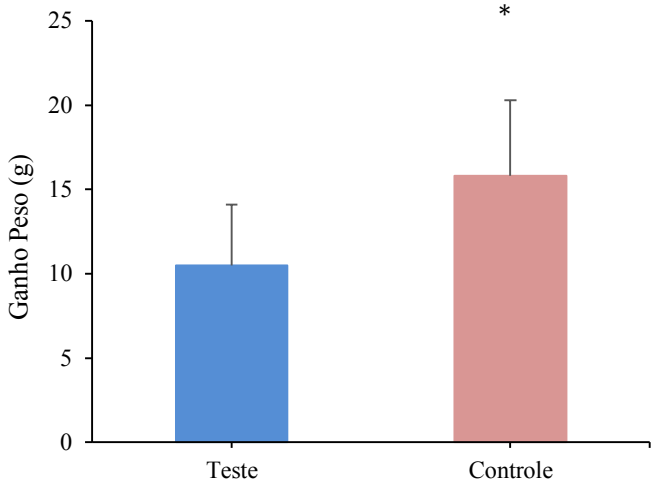
Wittney, p<0,05). No anexo B está apresentada a tabela com os valores das pesagens de cada animal durante a gestação.

Figura 4 - Valores médios e desvio padrão do peso dos animais prenhes dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis*, em relação aos animais do grupo controle, durante o período de prenhez.



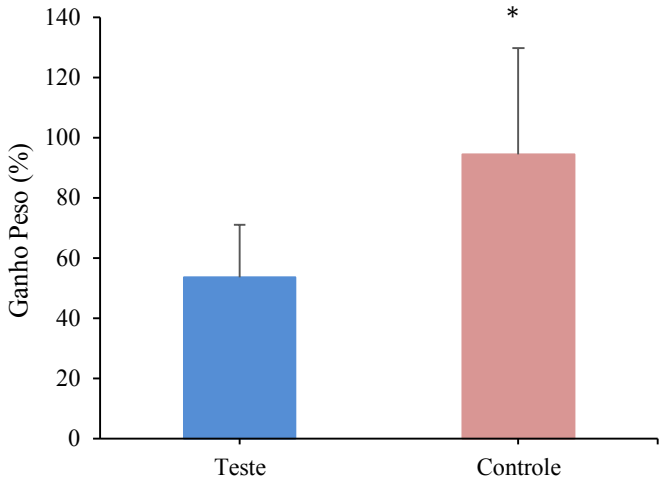
*** Diferença estatisticamente significante (Mann Wittney, p<0,05)**

Figura 5 - Valores médios e desvio padrão do ganho de peso dos animais prenhes dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis*, em relação aos animais do grupo controle, durante o período de prenhez.



*** Diferença estatisticamente significante (Mann Wittney, p<0,05)**

Figura 6 - Valores médios e desvio padrão da porcentagem de ganho de peso dos animais prenhes dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis*, em relação aos animais do grupo controle, durante o período de prenhez.



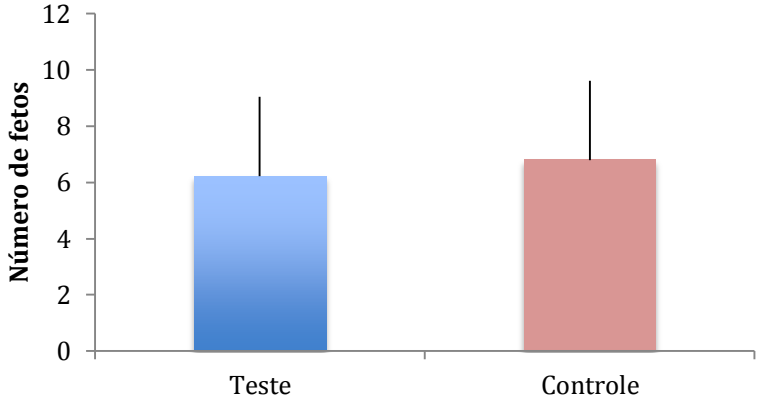
*** Diferença estatisticamente significante (Mann Wittney, p<0,05)**

4.1.3 Número de fetos

Foi verificada a presença de ao menos um feto em todos os animais submetidos à cesariana no 16º dia da gestação.

Os camundongos do grupo teste apresentaram menor número de fetos por ninhada em relação ao grupo controle, porém esta diferença não foi estatisticamente significante. A figura 7 mostra a média e o desvio padrão dos fetos observados nos grupos teste e controle e no anexo C, está apresentada a tabela com o número de fetos obtidos por cada animal prenhe.

Figura 7 - Média do número de fetos e desvio padrão dos animais prenhes dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis*, após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez em relação aos animais do grupo controle.



Não há diferença significante entre os grupos (Mann Wittney, p>0,05)

4.1.4 Peso fetal

Os fetos pertencentes ao grupo teste tiveram menor peso em relação aos fetos do grupo controle. Estas diferenças foram estatisticamente significantes (Mann Wittney, p<0,05). Na figura 8 estão apresentados os valores de média e desvio padrão do peso dos fetos obtidos de cada animal dos grupos teste e controle. Na figura 9, estão apresentados os valores de média e desvio padrão de todos os fetos de cada grupo, teste e controle. Os dados de peso de cada feto coletado por animal (até 3 fetos por animal) estão apresentados no anexo D.

Figura 8 – Média e desvio padrão do peso dos fetos de cada animal prenhe dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis* após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez em relação aos animais do grupo controle.

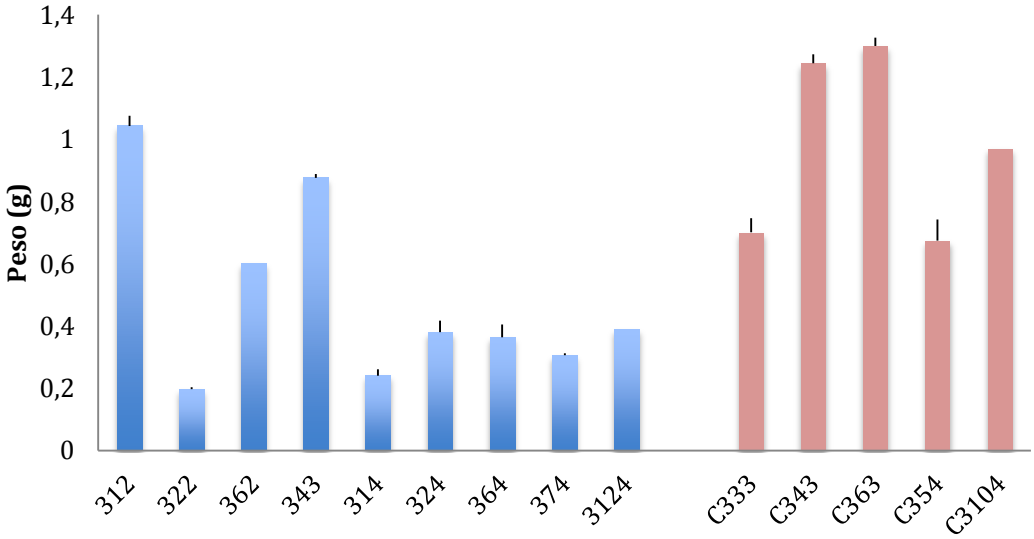
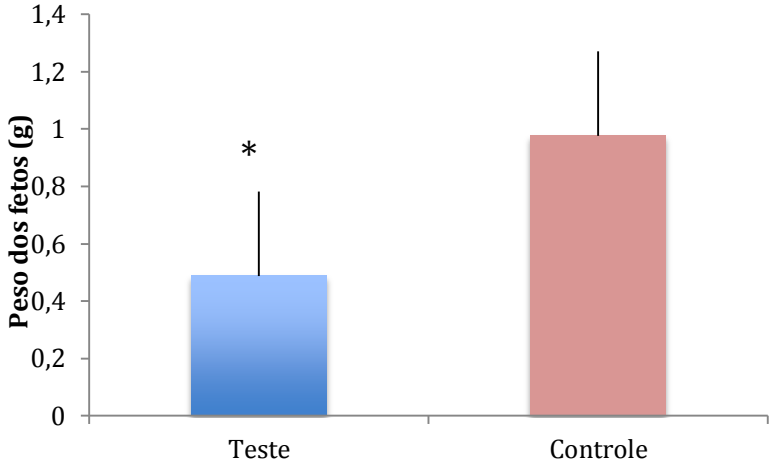


Figura 9 - Média e desvio padrão dos pesos fetos do grupo teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis* após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez em relação aos animais do grupo controle.

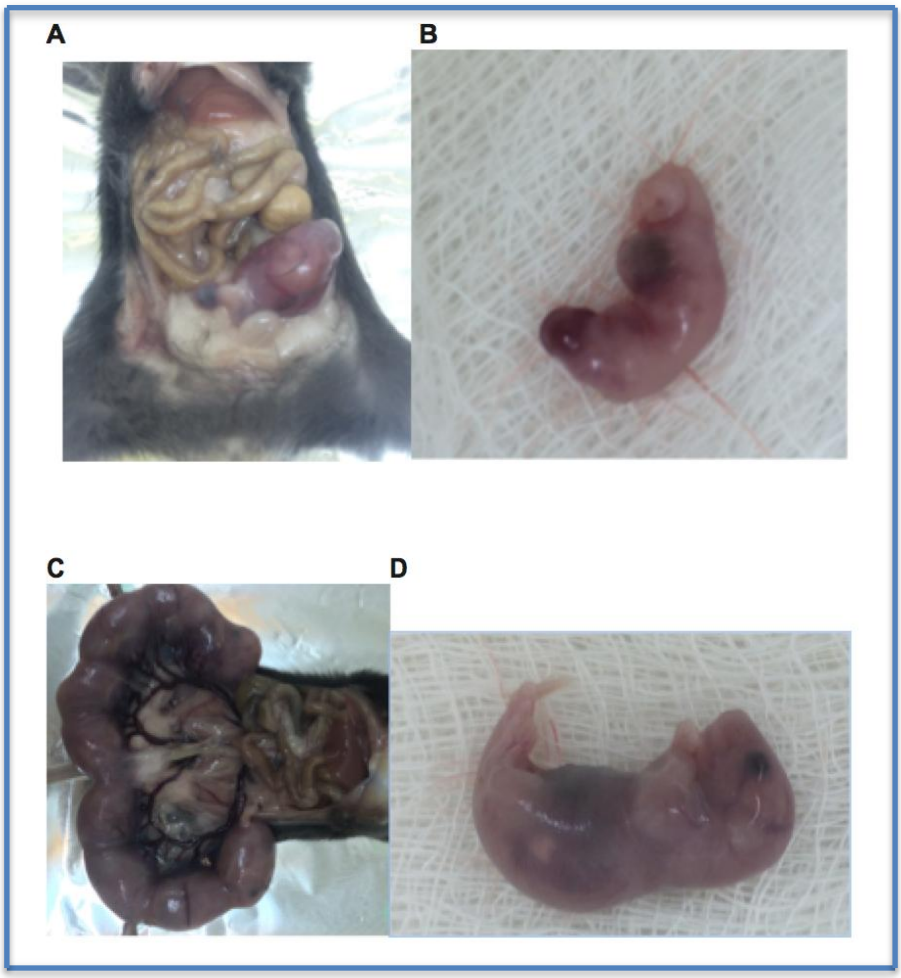


Diferença estatisticamente significante (Mann Wittney, p<0,05)

4.1.5 Reabsorção fetal

Não foram observados fetos reabsorvidos nos camundongos em que o periodontopatógeno foi inoculado (grupo teste), de maneira similar ao observado nos animais do grupo controle. No entanto, em um camundongo do grupo teste observamos má formação de um feto. Julgamos importante relatar que a infecção com *P. gingivalis* no animal (362) (figura 10) pode ter interferido no desenvolvimento fetal, que apresentava somente este feto, cujo desenvolvimento desta ninhada foi afetado.

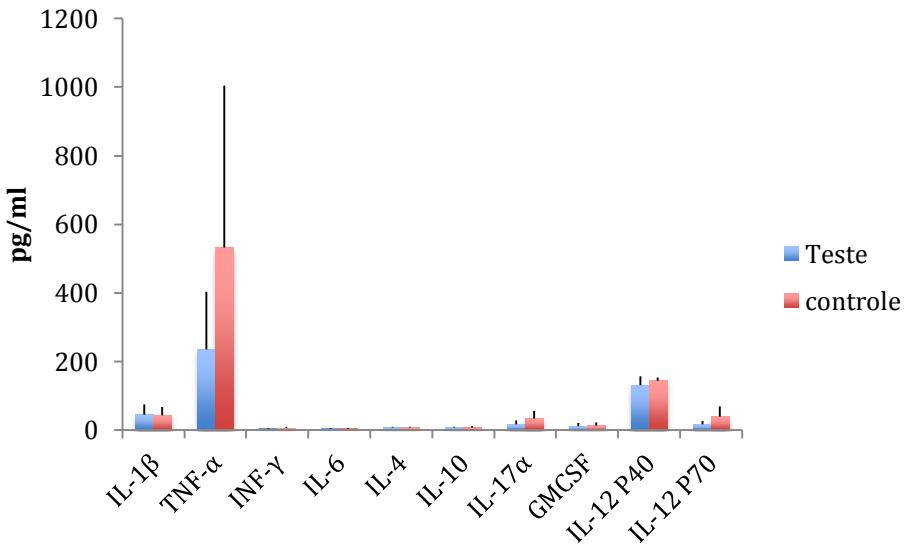
Figura 10 - Fotografia do animal 362, pertencente ao grupo teste (infectado por *P. gingivalis*) com apenas um feto (A) que apresentou uma deformação (B), comparado com animal controle, animal apresentando 9 fetos (C) feto com tamanho e formatos normais



4.1.6 Níveis de mediadores inflamatórias no soro

As dosagens das mediadores inflamatórios foram realizadas nas amostras de soros maternos retiradas no décimo sexto dia da gestação, por ELISA. Na figura 11 está apresentado o gráfico com os valores de média e desvio padrão da dosagem de mediadores inflamatórios (pg/ml) no soro materno dos grupos teste e controle, não houve significância estatística entre os grupos teste e controle. No anexo E está apresentada a tabela com o valor das médias e desvio padrão da dosagem de mediadores inflamatórios (pg/ml) no soro materno dos grupos teste e controle.

Figura 11- Valores de médias e desvios padrão de mediadores inflamatórios (pg/ml) no soro materno dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis* após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez e do grupo controle.



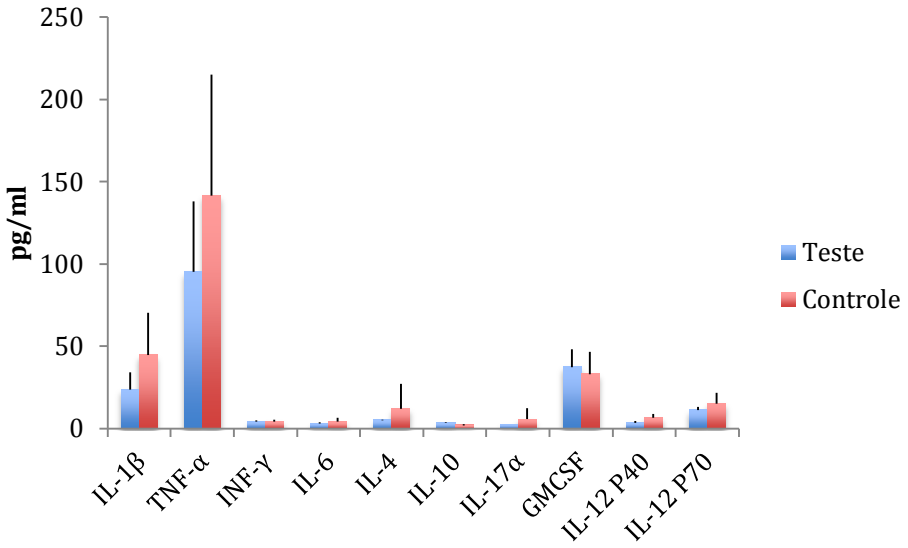
Não há diferença significante entre os grupos (Mann Wittney, p>0,05)

4.1.7 Níveis de mediadores inflamatórias no tecido gengival

As dosagens dos mediadores inflamatórios foram realizadas nas amostras de tecido gengival maternos retiradas da região de 1º molar superior esquerdo no décimo sexto dia da gestação e foram analisados através de ensaio ELISA. A figura 12 mostra os valores das médias e desvios padrão de mediadores inflamatórios (pg/ml) no tecido gengival materno dos grupos teste e controle. No anexo F está

apresentada a tabela com os valores das médias e desvio padrão da dosagem dos mediadores inflamatórios (pg/ml) no tecido gengival materno dos grupos teste e controle. Não houve significância estatística entre os grupos.

Figura 12 – Valores de médias e desvios padrão de mediadores inflamatórios (pg/ml) no tecido gengival materno dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis* após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez e do grupo controle.

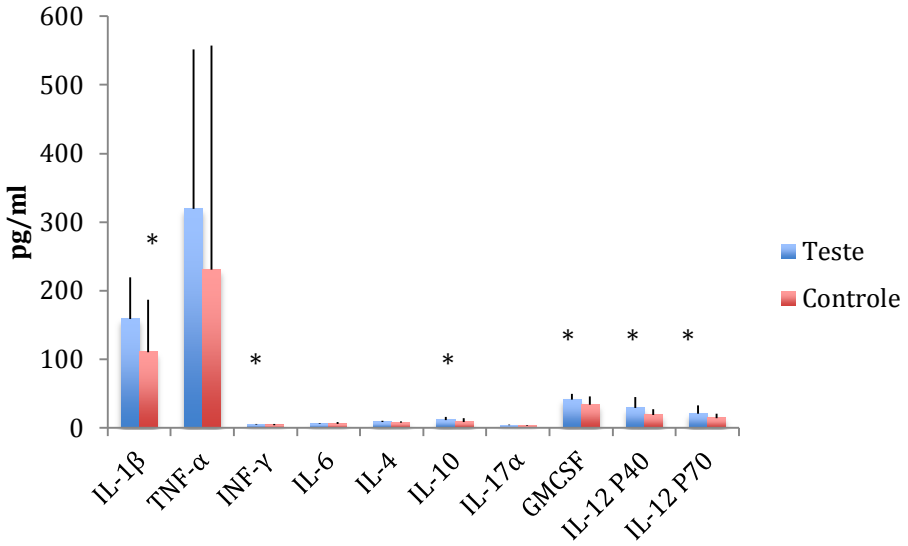


Não há diferença significante entre os grupos (Mann Wittney, p>0,05)

4.1.8 Níveis de mediadores inflamatórios na placenta

As dosagens dos mediadores inflamatórios foram realizadas nas amostras de placentas maternas retiradas no décimo sexto dia da gestação através de ensaio ELISA. A figura 13 mostra os valores das médias e desvio padrão de mediadores inflamatórios (pg/ml) na placenta dos grupos teste e controle. No anexo 8 está apresentada a tabela com os valores das médias e desvio padrão da dosagem desses mediadores (pg/ml) na placenta dos grupos teste e controle. Houve maior produção e diferença estatisticamente significante de IL-1β , INF-γ, IL-10, GMCSF, IL-12p40 e IL-12p70 nas placentas dos grupos testes em relação aos seus controles. No anexo G está apresentada a tabela com os valores médios e desvio padrão da dosagem de mediadores inflamatórios (pg/ml) na placenta dos grupos teste e controle.

Figura 13 - Valores de médias e desvios padrão de mediadores inflamatórios (pg/ml) nas placenta dos grupos teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis* após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez e do grupo controle.



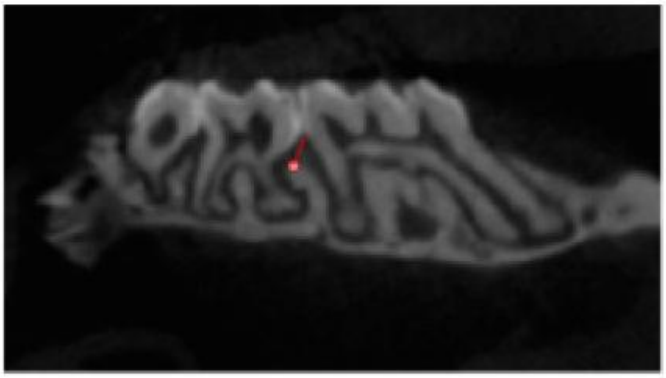
*** Diferença estatisticamente significante (Mann Wittney, p<0,05)**

4.1.9 Perda de osso alveolar

As maxilas foram analisadas através de microCT e a perda óssea determinada através da medida entre a JEC e a crista óssea-alveolar entre o primeiro e segundo molar superior direito, como demonstrado na figura 14. Os valores foram determinados e apresentados no anexo H. Os valores médios foram comparados entre grupo controle e grupo teste, como demonstrado na figura 15, indicando que os animais do grupo teste tiveram maior perda óssea alveolar do que os animais do grupo controle, e esta diferença foi estatisticamente significante (Mann Wittney, p<0,05).

Figura 14 – Fotografias do corte sagital e medida da JEC e a crista óssea- alveolar entre o primeiro e segundo molar superior direito em animal do grupo teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis* após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez e do grupo controle
(A) e em animal do grupo controle (B)

A



B

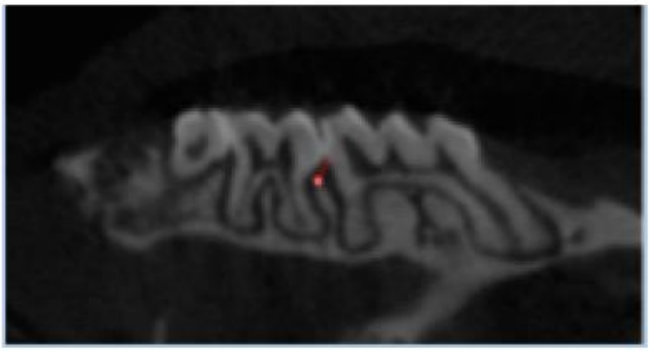
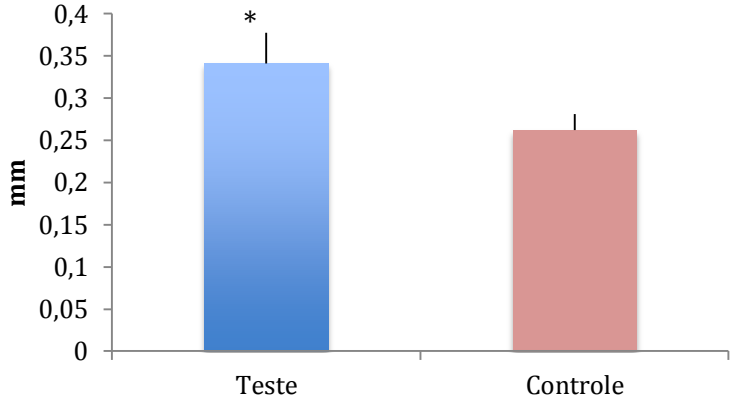


Figura 15 – Valor da média dos valores obtidos na medição entre a JEC e a crista óssea- alveolar entre o primeiro e segundo molar superior direito em animais do grupo teste infectados experimentalmente por *P. gingivalis* após 42 dias da infecção experimental por *P. gingivalis* e 16º dia de prenhez e do grupo controle.



*** Diferença estatisticamente significante (Mann Wittney, p<0,05)**

4.1.10 Correlação de Spearman

Utilizamos a correlação de Spearman para descrever a relação entre as diversas variáveis relacionadas ao padrão de prenhez como peso e número de fetos, % de ganho de peso materno e ganho de peso materno com mediadores inflamatórios.

Observa-se relação inversa das variáveis relacionadas ao padrão de prenhez e o nível de mediadores da inflamação na placenta, que apresentaram-se aumentados nos animais do grupo teste em relação ao grupo controle.

Apesar de não haver diferença nos níveis de mediadores inflamatórios no tecido gengival entre os grupos, observa-se relação inversa entre alguns mediadores no tecido gengival como IL-17 e IL-10 e as variáveis relacionadas ao padrão de prenhez, indicando que a resposta dos tecidos orais à infecção pode contribuir com as alterações na prenhez, e não apenas a infecção direta do agente na unidade feto-placentária.

Na figura 16 está a tabela com os valores de Correlação de Spearman entre variáveis relacionadas a alterações no padrão de prenhez em camundongos dos grupos teste (infectado com *P. gingivalis*) e controle (não infectado) em amostras obtidas no 16º dia da prenhez.

Figura 16 – Valores de Correlação de Spearman entre variáveis relacionadas a alterações no padrão de prenhez em camundongos dos grupos teste (infectado com *P. gingivalis*) e controle (não infectado) em amostras obtidas no 16º dia da prenhez. Valores de p entre parêntesis. Significante quando p<0,05.

	Porcentagem de ganho de peso materno	Ganho de Peso materno	Peso do fetos	Número de fetos
Placenta IL-1β			-0,6909 (0,0127)	
TNF-α		-0,6630 (0,0168)		
IL-4			-0,5956 (0,0318)	
IL-6				-0,6903 (0,0128)
IL-10			-0,6154 (0,0330)	
IL-17			-0,6623 (0,0169)	
GMCSF		0,6659 (0,0163)		
IL-12p40	-0,7319 (0,0083)		-0,6557 (0,0181)	
IL-12p70		-0,6425 (0,0205)	-0,7846 (0,0047)	
Soro IL-10	-0.6205 (0.0184)	-0.6938 (0.0124)	-0.6154 (0.0399)	
Tecido gengival IL-10			-0,5750 (0,0464)	
IL-17	-0,7319 (0,0083)		-0,6557 (0,0181)	
Número de fetos		0,5568 (0,0447)		
Peso dos fetos	0,6044 (0,0293)	0,6051 (0,0291)		

4.2 Efeito da doença experimental induzida por *A.actinomycetemcomitans*

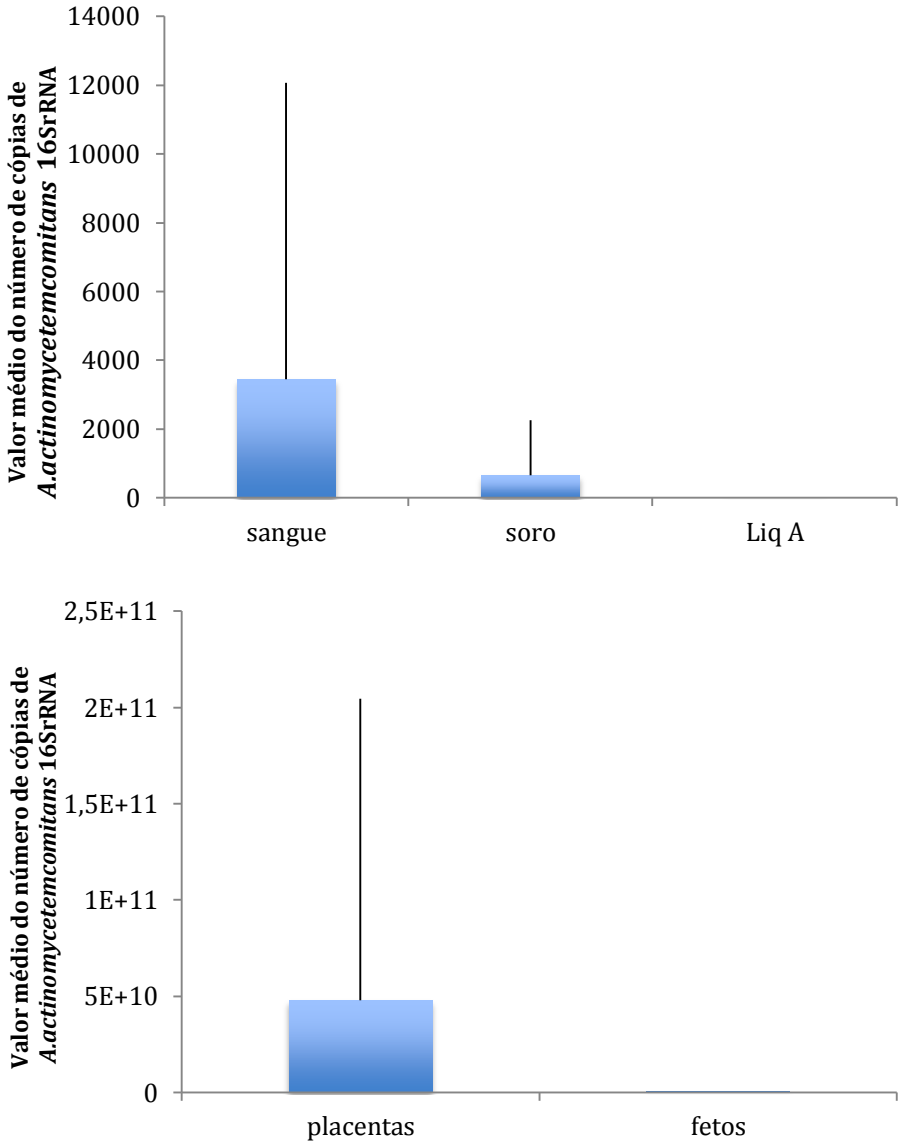
A infecção por *A.actinomycetemcomitans* foi realizada via i.v., visto que em ensaio piloto não foi obtida infecção persistente, necessária para cumprir os objetivos de determinar o efeito da infecção e bacteremia. Assim, foi empregado o protocoloco de infecção por *A.actinomycetemcomitans* como descrito por Tuomainen et al., 2008, que usou este protocolo mimetizando a bacteremia promovida durante a periodontite, para avaliar o efeito de *A.actinomycetemcomitans* sobre a aterogênese. Entre os 7 animais do grupo teste, um dos animais (animal 21) pariu filhotes no 16º dia da prenhez (16º dia após a detecção do plug vaginal), portanto dois dias antes do esperado, sugerindo que a infecção foi relacionada à prematuridade. Como neste animal várias análises foram impossibilitadas (peso da mãe ao final, análise de placentas e liquído amniótico) além do fato do nascimento alterar o perfil de citocinas da mãe, este foi excluído do estudo. Por outro lado, este dado pode ser importante, pois a infecção com *A.actinomycetemcomitans* sob este animal poderia ter interferido no desenvolvimento fetal. Este animal teve 4 filhotes, enquanto a média de fetos/grupo teste foi 5,16. Estes filhotes pesavam em média 1,62 g, enquanto a média de peso de fetos do grupo teste foi de 1,07 g. Estes dados sugerem que a prematuridade não foi associada a alterações gestacionais como redução do número ou peso dos fetos. Por outro lado, como o peso dos animais era maior que a média do grupo, é possível que esta prenhez tenha chegado a termo, e o plug vaginal tenha sido detectado mais tardiamente do que nos demais.

4.2.1 Presença de A.actinomycetemcomitans na unidade feto-placentária

Amostras da unidade feto-placentária (placenta, feto e líquido amniótico), soro, sangue, foram avaliadas quanto à presença de DNA de *A.actinomycetemcomitans.* O DNA de *A. actinomycetemcomitans* não foi detectado em nenhuma amostra de animais pertencentes ao grupo controle, mas foi detectado em pelo menos uma amostra em todos os animais do grupo teste. DNA de *A.actinomycetemcomitans* foi detectado em amostras de sangue (2/6), soro (1/6), fetos (11/14), placentas (11/14) e líquido amniótico (1/6) dos animais do grupo teste. A figura 17 mostra os valores médios e desvio padrão do número de cópias do gene *16SrRNA* de *A.actinomycetemcomitans* nas amostras do grupo teste. A quantidade

de cópias do gene *16SrRNA* de *A.actinomycetemcomitans* encontradas em cada amostra de cada animal estudado está detalhada no anexo I.

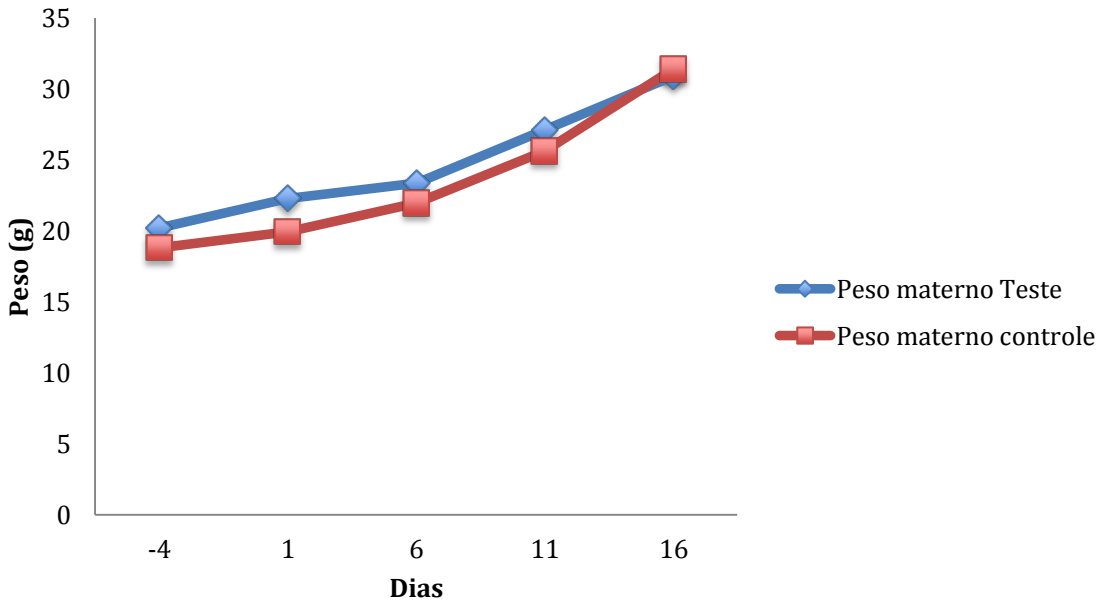
Figura 17 - Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão do número de cópias do gene *16SrRNA* de *A.actinomycetemcomitans* nas amostras do grupo teste, animais infectados experimentalmente nos 3º, 7º, 11º e 15º dias de prenhez por *A.actinomycetemcomitans.*



4.2.2 Ganho de peso materno

Os pesos dos camundongos foram anotados a cada 5 dias. Verificamos que os camundongos do grupo teste apresentaram menor porcentagem de ganho de peso ao final da gestação (16º dia) em relação ao peso inicial quando comparados com o grupo controle. Porém esta diferença não foi estatisticamente significante (Mann Wittney, p<0,05). Na figura 18 está apresentado o gráfico com as médias e desvio padrão do peso dos animais do grupo teste e controle ao longo da prenhez. Os valores das pesagens de cada animal de ambos os grupos estão apresentados no anexo J.

Figura 18 - Valores médios e desvio padrão do peso dos animais prenhes dos grupos teste, infectados experimentalmente por *A. actinomycetemcomitans*, e controle, durante o período de prenhez.



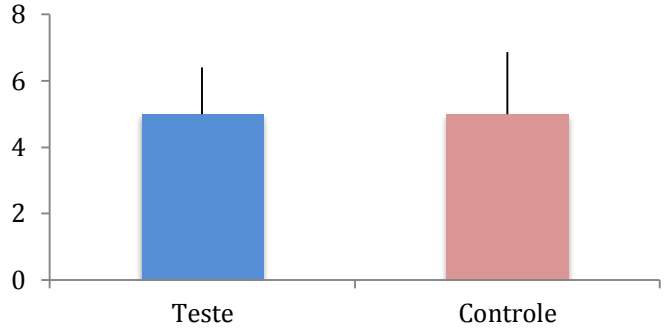
Não há diferença significante entre os grupos (Mann Wittney, p>0,05)

4.2.2.1 Número de fetos

Foi verificada a presença de ao menos um feto em todos os animais submetidos à cesariana no 16º dia da gestação. Não houve diferença nas médias dos números de fetos obtidos nos dois grupos.

A figura 19 mostra as médias e os desvios padrão do número de fetos observados nos grupos teste e controle e no anexo K está apresentada a tabela com o número de fetos obtidos por cada animal.

Figura 19 - Média do número de fetos e desvio padrão dos animais prenhes do grupo teste, infectado experimentalmente por *A. actinomycetemcomitans* nos 3º, 7º, 11º e 15º dias de prenhez, e do grupo controle.



Não há diferença significante entre os grupos (Mann Wittney, p>0,05)

4.2.2.2 Peso fetal

Os fetos pertencentes ao grupo teste tiveram menor peso do que os fetos do grupo controle, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significante (Mann Wittney, p<0,05). Na figura 20 estão apresentados os valores de média e desvio padrão do peso dos fetos obtidos por cada animal prenhe do grupo teste e controle. Na figura 21 estão apresentados os valores de média e desvio padrão de todos os fetos de cada grupo, teste e controle, os dados de peso de cada feto coletado por animal (até 3 fetos por animal) estão apresentados no anexo L.

Figura 20 - Média e desvio padrão do peso dos fetos de cada animal prenhe do grupo teste infectado experimentalmente por *A. actinomycetemcomitans* nos 3º, 7º, 11º e 15º dias de prenhez, e do grupo controle.

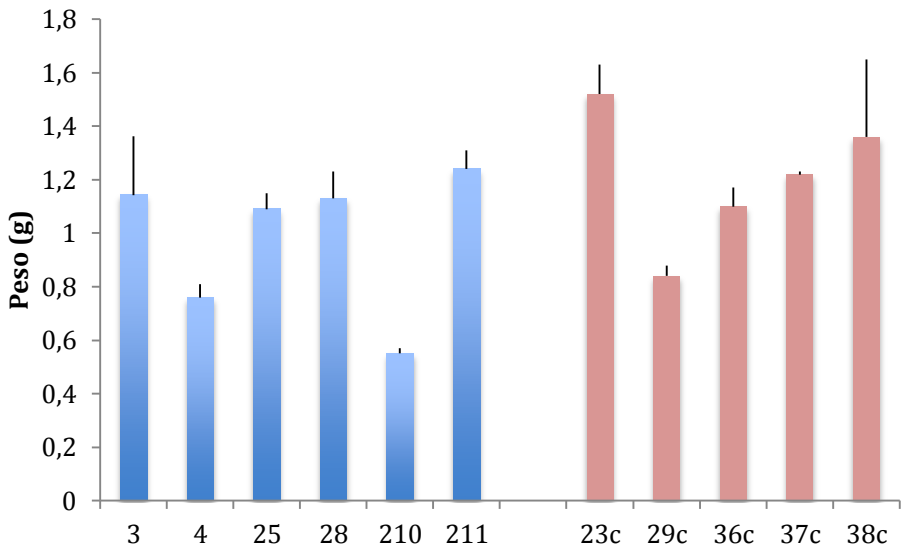
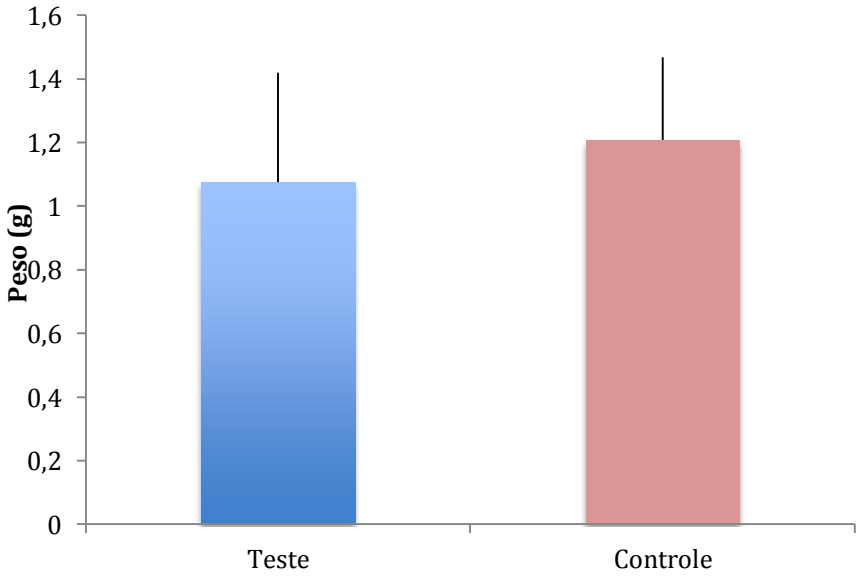


Figura 21 - Média e desvio padrão dos pesos dos fetos do grupo teste, infectado experimentalmente por *A. actinomycetemcomitans* nos 3º, 7º, 11º e 15º dias de prenhez, e do grupo controle.



Não há diferença significante entre os grupos (Mann Wittney, p>0,05)

4.2.2.3 Reabsorção fetal

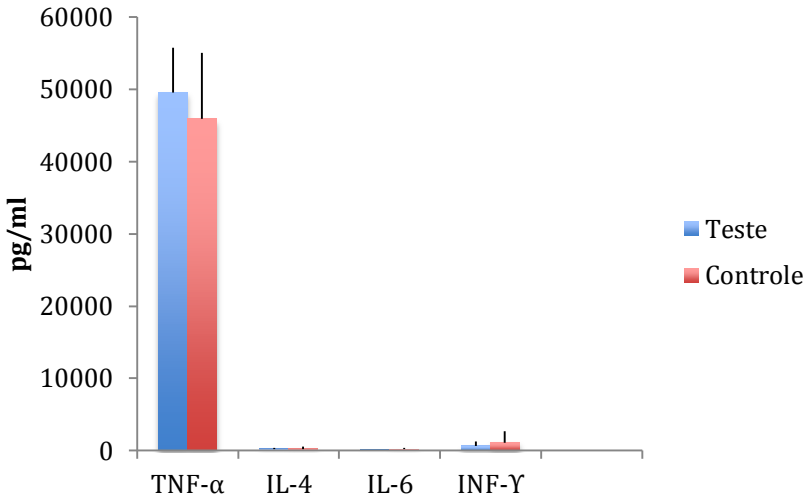
A presença de fetos foi verificada em todos os camundongos do grupo controle e teste, quando submetidos à cesariana no 16º dia da gestação. Não foram observados fetos reabsorvidos nos camundongos do grupo teste em que o periodontopatógeno foi inoculado.

4.2.3 Níveis de mediadores inflamatórios no soro e placenta

4.2.3.1 Níveis de mediadores inflamatórios no soro

As dosagens dos mediadores inflamatórios foram realizadas nas amostras de soros maternos retiradas no décimo sexto dia da prenhez, por ELISA. Na figura 22 está apresentado o gráfico com os valores de média e desvio padrão dos níveis de mediadores inflamatórios (pg/ml) no soro materno dos grupos teste e controle. No anexo L está apresentada a tabela com o valor das médias e desvios padrão da dosagem de mediadores inflamatórios (pg/ml) no soro materno dos grupos. Os resultados indicaram que a infecção experimental por *A.actinomycetemcomitans* não interferiu nos níveis séricos de mediadores inflamatórios.

Figura 22 - Valores de médias e desvios padrão de mediadores inflamatórios (pg/ml) no soro materno do grupo teste infectado experimentalmente por *A. actinomycetemcomitans* nos 3º, 7º, 11º e 15º dias de prenhez e do grupo controle.

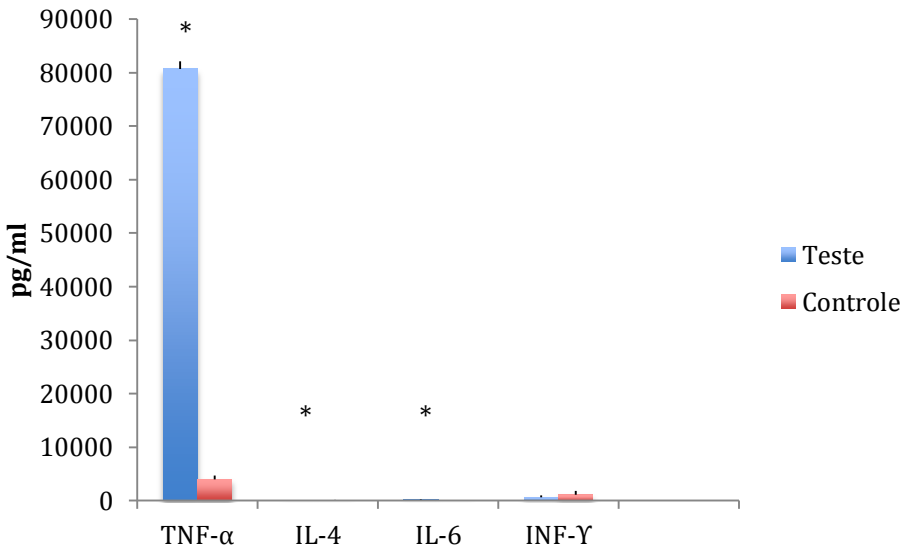


Não há diferença significante entre os grupos (Mann Wittney, p>0,05)

4.2.3.2 Níveis de mediadores inflamatórios nas placentas

As dosagens dos mediadores inflamatórios foram realizadas nas amostras de placentas retiradas no décimo sexto dia da prenhez, por ELISA. Na figura 23 está apresentado o gráfico com os valores de média e o desvio padrão de mediadores inflamatórios(pg/ml) nas placentas dos animais teste e controle, houve maior nível de TNF-α, IL-4, IL-6 nas placentas do grupo teste enquanto os níveis de IL-17 foram maiores nas placentas dos animais do grupo controle (Mann Wittney, p<0,05). No anexo M está apresentada a tabela com o valor das médias e desvio padrão da dosagem de mediadores inflamatórios (pg/ml) nas placentas dos grupos teste e controle

Figura 23 - Valores de médias e desvios padrão de mediadores inflamatórios (pg/ml) na placenta dos animais do grupo teste infectados experimentalmente por por *A.actinomycetemcomitans* nos 3º, 7º, 11º e 15º dias de prenhez e do grupo controle.



*** Diferença estatisticamente significante (Mann Wittney, p<0,05)**

4.2.3.3 Correlação entre variáveis relacionadas ao padrão gestacional e produção de citocinas.

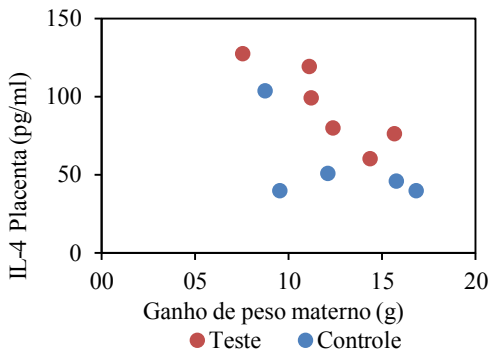
O teste de correlação de Spearman foi empregado para relacionar variáveis relacionadas ao ganho de peso materno, peso materno, peso fetal e número de fetos ao final da prenhez e níves de citocinas séricas e das placentas nos animais dos grupos teste (infectados por *A. actinomycetemcomitans*) e controle.

A tabela da figura 24 apresenta os dados de correlação estatisticamente sinificantes entre as variáveis. Observa-se apenas relação entre os níveis de IL-4 na placenta e variáveis relacionadas ao peso materno. O gráfico da figura 25 mostra a distribuição dos animais segundo o ganho de peso materno e os níveis placentários de IL-4.

Figura 24 – Valores de Correlação de Spearman entre variáveis relacionadas a alterações no padrão de prenhez em camundongos dos grupos teste (infectado com *A. actinomycetemcomitans.*) e controle (não infectado) em amostras obtidas no 16º dia da prenhez. Valores de p entre parêntesis. Significante quando p<0,05.

	IL-4 Placenta	Peso Materno final
Peso materno final	-0,9429 0,0350	
Ganho de peso materno	-0,8857 0,0476	
Número de fetos		0,8986 0,0445

Figura 25 - Distribuição dos animais dos grupos teste (infectado com *A. actinomycetemcomitans*) e controle segundo os níveis placentários de IL-4 e ganho de peso materno.



5 Discussão

Periodontite crônica é uma doença inflamatória que afeta os tecidos de suporte dos dentes, resultante da interação entre a microbiota periodontal e respostas multifatoriais do hospedeiro. *P. gingivalis* e *A.actinomycetemcomitans* possuem propriedades que induzem à disbiose da microbiota, por alterar o microambiente subgengival alterando a resposta do hospedeiro (Hajishengallis, 2015).

Apesar da presença de bactérias ser fator inicial para o estabelecimento da doença, a resposta do hospedeiro contribui para a progressão da doença (Bartova et al., 2014). No contexto da periodontite, elevados níveis de bactérias gram-negativas podem levar ao aumento dos níveis de LPS na circulação, o que induz a produção de mediadores inflamatórios, perpetuando o quadro inflamatório e favorecendo a inflamação sistêmica (Shaddox et al., 2011).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o papel de patógenos periodontais em alterações gestacionais. Existem muitos dados na literatura que demonstam uma forte associação entre infecção intrauterina e alterações gestacionais (DiGiulio , 2012). Patógenos periodontais também podem estar envolvidos no processo, e existe associação entre periodontite e o nascimento de bebês prematuros e de baixo peso (Leon et al., 2007; Offenbacher et al., 1996). No entanto, os mecanismos e os patógenos envolvidos neste processo ainda não foram elucidados. *P. gingivalis* e *A.actinomycetemcomitans* são considerados patógenos periodontais, embora seus mecanismos de virulência e sua associação com as diferentes formas de periodontite sejam distintos (Kesavalu et al., 2002).

O modelo experimental de doença periodontal induzida por *P. gingivalis* é bem estabelecido na literatura (Baker et al., 2000; de Molon et al., 2013; Lin et al., 2003), e o protocolo utilizado no presente estudo permitiu infecção persistente e resultou em destruição alveolar.

Os nossos dados usando infecção oral com *P. gingivalis* indicaram que uma colonização prolongada foi obtida, pois, apesar da bactéria não ter sido encontrada na cavidade oral em todos os animais, o patógeno foi encontrado em sítios extra-orais ao final do período experimental no grupo de animais infectados. Nossos dados indicam que 4 entre 9 animais do grupo teste apresentavam infecção oral por *P. gingivalis* (3 no biofilme dental, e 1 no tecido gengival e biofilme). Estes dados

estão de acordo com os outros estudos, mostrando que *P. gingivalis* pode ser isolado a partir da cavidade oral de camundongos infectados até 42 dias depois da infecção (Hellström et al., 2004). Outros estudos relatam infecção experimental prolongada na cavidade oral por *P. gingivalis*, utilizando um protocolo semelhante ao utilizado no presente estudo, onde 22 dos 24 animais apresentavam infecção em tecidos orais 42 dias após a última inoculação (Marchesan et al., 2012). A presença de outros organismos pode favorecer a colonização por *P. gingivalis*, como em estudo que mostrou que *P. gingivalis* inoculado com *F. nucleatum* resultou em infecção persistente por seis semanas (Shusterman et al., 2013). No entanto, no presente estudo optamos por inocular apenas *P. gingivalis*, pois a inoculação de ambos os organismos dificultaria a determinação do efeito de *P. gingivalis* isoladamente, visto que *F. nucleatum* foi associado a alterações gestacionais em modelos experimentais (Liu et al., 2007), e é capaz de colonizar também a mucosa vaginal (Gonzales-Marin et al., 2011).

No presente estudo, o grupo infectado com *P. gingivalis* apresentou perda óssea alveolar, evidenciando que o protocolo experimental foi capaz de induzir a doença periodontal em camundongos, acompanhada por mudanças no perfil de citocinas e disseminação hematogênica de *P. gingivalis*. Outros modelos de infecção oral por *P. gingivalis* e avaliação dos seus efeitos sobre a gestação já foram utilizados (Ao et al., 2015). Neste estudo, as câmaras pulpares dos dentes de camundongos foram infectadas com *P. gingivalis*, e após o estabelecimento da infecção pulpar por 6 semanas, os animais foram postos para acasalamento. Neste modelo, a infecção é mais localizada que a obtida no presente estudo, e o micro-organismo ganha acesso à unidade feto-placentária apenas por bacteremia a partir do foco oral. Por outro lado, a infecção da mucosa oral, como empregada no presente estudo, permite que grandes quantidades da bactéria sejam constantemente engolidas via saliva. Este dado é relevante, pois a infecção experimental por *P. gingivalis* em camundongos pode causar alterações na microbiota intestinal, com aumento na proporção de *Bacteroidetes* e redução da proporção de *Firmicutes.* Estas alterações se relacionam com redução na expressão de proteínas de ligação (tight-junction) no íleo, e com o desenvolvimento de endotoxemia e inflamação sistêmica (Arimatsu et al., 2014).

Diferindo do estudo publicado por Arimatsu et al., 2014, no presente trabalho, *P. gingivalis* foi detectada em amostras de fezes de um animal e de intestino de

outro, empregando a mesma técnica para detecção (qPCR). Embora isto não signifique que a bactéria estava colonizando o intestino dos animais teste, a detecção de *P. gingivalis* no intestino/fezes, tal como mostrado neste estudo, pode indicar a sobrevivência de *P. gingivalis* ao longo do trato digestivo.

Outro aspecto interessante do modelo de infecção oral empregado refere-se ao fato de que as comunidades microbianas do intestino são preditoras da comunidade oral, apesar das diferenças na composição microbiana do intestino e da cavidade oral (Ding, Schloss, 2014). Assim, no modelo empregado de indução de periodontite por *P. gingivalis*, a bactéria poderia chegar á unidade feto-placentária via hematogênica a partir de focos de infecção oral. Mas também seus efeitos poderiam ser potencializados pela alteração da microbiota intestinal e consequente endotoxemia. Além disso, a produção de mediadores inflamatórios local na cavidade oral, sistêmica e local na unidade feto-placentária promovida pela infecção por *P. gingivalis* poderia corroborar para as alterações no padrão gestacional, de uma maneira mais próxima da realidade em pacientes com periodontite do que no modelo empregado por Ao et al., 2015.

No presente estudo foi utilizado o isolado de *Porphyromonas gingivalis* HW 24D-1 classificado como fimA genótipo IV, não encapsulado, altamente fimbriado com altas taxas de adesão a células epiteliais (Teixeira et al., 2009), a fim de facilitar a sua aderência a tecidos orais e, possivelmente, a sítios extra-orais. Um estudo anterior do nosso grupo, avaliando o papel da infecção experimental com *P. gingivalis* em ratos, utilizando um modelo de abcesso, empregou uma cepa encapsulada e afimbriada de *P. gingivalis* (W83) (Michelin et al., 2012), devido à sua capacidade de promover um abcesso difuso (Grenier et al., 2001). A cepa W83 também foi utilizada no estudo de Ao et al., 2015. No entanto, no presente estudo, optamos por uma cepa fimbriada / não-encapsulada, uma vez que a presença de fímbrias em *P. gingivalis* leva a um aumento da capacidade de colonização da unidade feto-placentária por este patógeno (Belanger et al., 2008).

A cepa escolhida de *P. gingivalis* foi capaz de atingir e colonizar sítios extra-orais, especialmente o fígado e intestino. Estes dados estão de acordo com os outros relatando que, durante a infecção dos tecidos periodontais, os micro-organismos não são restritos apenas aos sítios subgengivais, mas podem se disseminar via hematogênica, por bacteremia (Perez-Chaparro et al., 2008). Estudos têm mostrado que *P. gingivalis* pode ser detectada em vários órgãos distantes tais

como o fígado (Lin et al., 2003; Yoneda et al., 2012), tecido cardiovascular (Hokamura et al., 2010), em trompa de falópio (Hirata et al., 1995) e no útero materno (Lin et al., 2003).

O uso da amostra fimbriada de *P. gingivalis* pode ter favorecido a colonização da placenta no presente estudo. Apesar do desafio no presente estudo ter sido feito pela inoculação oral com *P. gingivalis,* em contraste com o processo agudo no modelo de abcesso (Michelin et al., 2012), a porcentagem de amostras de placenta positivas para a espécie no presente estudo (30% das placentas, 100% do animais) é maior do que a relatada anteriormente (entre 3,03 - 7,69% das placentas) (Michelin et al., 2012). No estudo de Ao et al., 2015, o periodontopatógeno também foi encontrado em amostras de placenta do grupo infectado, usando imunoistoquímica e neste qPCR, embora os autores não tenham descrito o número de amostras de placentas infectadas em relação ao total (Ao et al., 2015). A comparação entre os estudos é dificíl também por outras variáveis incluindo o modelo de infecção (infecção oral, abscesso subcutâneo e infecção da camara pulpar), a sensibilidade do método de detecção (por PCR contra qPCR), espécies animais (ratos e camundongos) e diferenças na cepa de *P. gingivalis* empregada.

A gravidez pode ser considerada como um milagre fisiológico. Assim, uma resposta inflamatória excessiva e persistente materna está associada a alterações no padrão gestacional. A infecção por periodontopatógenos leva a uma inflamação crônica durante a gravidez o que pode quebrar o estado de tolerância, levando a trabalho de parto prematuro e outros efeitos adversos em gestação (para uma revisão, ver Zi et al., 2015).

O período de gestação normal de um camundongo leva em torno de 17 a 18 dias para o nascimento dos filhotes. Assim, a escolha para o sacrifício no 16º dia se deu para que a placenta e líquido amniótico pudessem ser coletados e permitiu a comparação de parâmetros a serem analisados, como peso materno e fetal.

Os dados do presente estudo indicam que a infecção experimental oral por *P. gingivalis* resultou em baixo peso dos fetos quando foram comparados os animais do grupo teste e do grupo controle (0,39 g, no grupo teste e de 0,97 g no grupo controle). Desde o primeiro estudo caso-controle em humanos relacionando doença periodontal e prematuridade (Offenbacher et al., 1996), outros estudos clínicos evidenciaram a relação de prematuridade/baixo peso ao nascimento e a doença periodontal (Marin et al., 2005; Romero et al., 2002). Este dado indica que a infecção

oral da mãe por *P. gingivalis* tem um impacto na qualidade de vida do neonato, já que o baixo peso ao nascer está ligado ao retardo no crescimento, doenças infecciosas, morte na infância, entre outros efeitos (Romero et al., 2014). Em estudo recente sobre o efeito de infecção oral experimental por *P. gingivalis*, este dado também foi observado (Ao et al., 2015).

Verificamos também que ao final da gestação, os animais inoculados com *P. gingivalis* tiverem menor peso em relação aos animais controle. No modelo de abcesso em ratas (Michelin et al., 2012), os animais infectados no 1º e 11º de gestação apresentaram menor porcentagem de ganho de peso no final da gestação (20º dia) em relação ao peso inicial quando comparados com o grupo controle. Tanto no presente estudo, como no estudo experimental de abcesso observaram-se redução no número de fetos/filhotes por ninhada em relação aos seus grupos controle, porém em ambos os estudos não houve diferença significante entre os grupos.

Micro-organismos interagem com receptores como os receptores da família toll-like (TLRs) em monócitos, macrófagos e outras células tais como fibroblastos, células endoteliais, células dendríticas (DC), linfócitos e neutrófilos e induzem a ativação intracelular de vias como do fator nuclear kappa B e várias quinases, levando a produção e liberação de citocinas (Ulevitch, 2004). Assim, a fim de avaliar o efeito da infecção por *P. gingivalis* sobre os níveis de mediadores inflamatórios nos animais infectados, analisamos biomarcadores no soro, tecido gengival e placenta. Estes e outros fluidos biológicos, incluindo urina, saliva e fluido cérvico-vaginal humano, fornecem ricas fontes de proteínas e moléculas que são significativamente alteradas em resposta a diferentes estados biológicos, e podem ser pesquisados como biomarcadores de várias doenças e condições (Heng et al., 2015).

No presente estudo não foram observadas diferenças nos níveis no tecido gengival de citocinas inflamatórias IL-1β, TNF-α, IL-4, IL-17α,IL-12p40, IL-12p70, após 42 dias de infecção com *P. gingivalis*, o que possivelmente indica que a doença periodontal não estaria mais progredindo, uma vez que citocinas pró-inflamatórias são relacionadas a reabsorção óssea (Lerner et al., 2006). Possivelmente os níveis destes marcadores estiveram altos no ínicio da doença, e ao final de 42 dias foi possível observar aumento não significativo de IL-1β, TNF-α, IL-12p40, e IL-12p70 nos tecidos gengivais. IL-1β induz a diferenciação de osteoclastos e reabsorção óssea (Gowen, Mundy, 1986), e níveis aumentados de IL-

1β foram estreitamente associados com a gravidade da doença periodontal, podendo servir como um marcador de destruição dos tecidos (Ishihara et al., 1997). TNF-α é uma citocina pró-inflamatória que, juntamente com a IL-1β, induz a regulação de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais, estimulando a produção de quimiocinas que fazem o recrutamento de leucócitos circulantes para os locais de inflamação e induzem a expressão de outros mediadores inflamatórios que potencializam a resposta inflamatória, como as prostaglandinas e MMPs (Graves, Cochran, 2003). Usando um modelo de primatas não humanos da doença periodontal (Delima et al., 2001), foi demonstrado que os antagonistas solúveis para IL-1β e TNF-α são capazes de reduzir a perda de inserção do tecido conjuntivo e osso alveolar, o que sugere uma relação causa - efeito entre estes marcadores e doença periodontal.

No presente estudo também não foram observadas diferenças significantes nos níveis séricos de citocinas entre os animais dos grupos teste e controle. Estes dados diferem dos obtidos usando outros modelos de infecção. No modelo de infecção subcutânea em ratos (Michelin et al., 2012), a infecção experimental por *P. gingivalis* W83 induziu maiores níveis séricos de IL-6 e TNF- α. Também no modelo de infecção por câmara pulpar seguida de acasalamento (Ao et al., 2015), os animais infectados com a cepa W83 apresentavam níveis séricos maiores de TNF-α (2,5 vezes maior), IL-1β (2 vezes maior), IL-6 (2 vezes maior), IL-17(mais do que 2 vezes maior). Além disso, quando camundongos foram desafiados com *P. gingivalis* A7436 através de injeção intravenosa em câmeras subcutâneas, foram demonstrados aumento nos níveis séricos de TNF-α e redução dos níveis séricos de IL-10 (Lin et al., 2003). Portanto, os dados indicam que, no presente estudo, o desafio induzido pela infecção oral pela cepa HW24D-1 foi menor do que nos demais estudos, induzindo menor resposta de citocinas inflamatórias a nível sistêmico.

É digno mencionar que as citocinas induzidas pela infecção com diferentes cepas de *P. gingivalis* pode ser diferente, e uma estirpe não-encapsulada, como a cepa utilizada neste experimento, HW24-D1, induz níveis mais elevados de IL-10 do que a cepa encapsulada W83 (Marchesan et al., 2012). Além disso, os estudos apontaram várias diferenças na resposta de *P. gingivalis in vitro* e *in vivo*, e as diferenças entre as estirpes *in vitro* podem não ser reproduzidas *in vivo* (Marchesan et al., 2012). Isto pode ser devido à expressão de fatores de virulência que podem

diferir de acordo com as condições ambientais. Além disso, a infecção oral por *P. gingivalis* provoca uma disbiose na microbiota residente oral e do intestino e a resposta não é somente dirigida a uma única espécie, mas à toda a comunidade disbiótica (Hajishengallis, 2015).

Apesar da infecção oral com *P.gingivalis* não ter resultado em maiores níveis de mediadores inflamatórios estudados nas amostras de soro e tecido gengival do grupo teste em relação ao grupo controle após 42 dias da primeira inoculação, foram observadas diferenças nos níveis de citocinas na placenta entre os dois grupos. Vale ressaltar que no presente estudo, *P. gingivalis* foi detectada na maiora das amostras de placenta do grupo teste.

Uma gravidez bem sucedida é caracterizada por uma resposta Th2 com uma predominância de citocinas como a IL-4, IL-10, TNF-α, IFN-γ e IL-2 na placenta (Raghupathy, 2001). Por outro lado, estudos referentes ao terceiro trimestre de gestação mostraram aumento nos níveis circulantes de biomarcadores pró-inflamatórios, tais como TNF-α, IL-8, IL-1β, MIP e IFN-γ nos casos de alterações gestacionais como pré-eclâmpsia enquanto os níveis de citocinas em circulação com funções anti-inflamatórias, tais como IL-10 e IL1-Ra e de biomarcadores imuno-moduladores, incluindo IL-6, IL-2, IL-4 e IL-18 têm sido implicados na pré-eclampsia (Szarka et al., 2010). De fato, uma revisão sistemática e uma revisão da literatura relataram que os níveis de IL-6 no líquido amniótico estão entre os melhores fatores preditivos para a inflamação intra-amniótica associada a parto prematuro (Krupa et al., 2006; Vrachnis et al., 2012).

Entre os animais teste, infectados com *P. gingivalis*, foram observados maiores níveis de IL-1β, INF-γ, IL-10, GMCSF, IL-12p40 e IL-12p70 na placenta quando comparados ao grupo controle. Esta observação está de acordo com a alta prevalência de placentas infectadas no grupo teste.

Os níveis de IL-10 maiores nas placentas do grupo infectado com *P. gingivalis* do que no controle possivelmente é associado a um mecanismo de feed-back, visto que esta citocina é induzida para o controle da inflamação, por citocinas pro-inflamatórias como IL-12. É interessante notar que empregamos uma cepa não capsulada de *P. gingivalis*, que induz maiores níveis de IL-10 que a cepa capsulada W83 (Marchesan et al., 2012), utilizada na maioria dos estudos (Ao et al., 2015; Lin et al., 2003; Michelin et al., 2012). Os maiores níveis placentários de IL-10 nos animais infectados contrastam com os dados obtidos em estudo de infecção

subcutânea com a cepa W83, onde não houve aumento na produção de IL-10 na placenta de animais infectados (Michelin et al., 2012). Mas, deve ser ressaltado que no estudo citado, uma porcentagem muito baixa de placentas apresentava-se infectada, diferindo dos nossos dados.

A IL-10 é expressa constitutivamente em trofoblastos das vilosidades da placenta mas não em trofoblastos extravilosas. Além disso, células NK uterinas, monócitos, e células Tregs da decídua são também importantes produtores de IL-10. IL-10 não é essencial para o crescimento e desenvolvimento do feto em camudongos, mas desempenha um papel importante para inibir a inflamação excessiva. Estes resultados sugerem que IL-10 atua como um agente protetor durante a infecção e a deficiência de IL-10 exacerba a inflamação em camundongos (Chatterjee et al., 2014). Por outro lado, o aumento de IL-10 próximo ao parto não é esperado, pois este aumento na produção de IL-10 ocorre durante o primeiro e segundo trimestre mas não no terceiro trimestre em mulheres grávidas normais. Além disso, a produção de IL-10 é diminuida antes do parto e aumentada após o parto (Chatterjee et al., 2014).

Por outro lado, o aumento na produção de IL-10 poderia estar favorecendo a perpetuação da bactéria na unidade feto-placentária. Estudo recente mostra que a salmonelose experimental também induz aumento de IL-10, e que esta tem efeito sobre o perfil gestacional (Noto et al., 2014). IL-10 em favorece a proliferação intracelular de bactérias e os dados com o modelo de salmonelose sugerem que a elevada carga bacteriana na placenta pode estar relacionada com o aumento da expressão de IL-10 produzida na placenta. IL-10 produzida por trofoblastos impede a maturação de vacúolos contendo a *Salmonella*, culminando em profunda proliferação bacteriana no início de formação dos fagossomos. De fato, as células trofoblásticas fornecem um nicho endossomal seguro para *Salmonella* multiplicar-se em baixas condições de estresse (Nguyen et al., 2013).

Estudo similar com *Listeria monocytogenes,* outro patógeno intracelular, mostraram que IL-10 é dispensável para manter a gravidez, mas prejudica a defesa do hospedeiro contra a infecção. Os dados sugerem ainda que a neutralização de IL-10 poderia ser utilizada para aumentar a imunidade contra a infecção, sem comprometer a gravidez (Rowe et al., 2011).

No presente estudo, os níveis placentários de IL-10 aumentaram nos animais infectados, e isso poderia ser associado à presença da bactéria na unidade feto-

placentária. O mecanismo de invasão é uma importante propriedade adotada também pelo periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis* (Lamont, Yilmaz, 2002). *Porphyromonas gingivalis* invade células epiteliais e fibroblastos, e pode se localizar em vacúolos, liberados na forma de vesículas (Sandros et al., 1993). Mas, estas observações não foram confirmadas por outros autores (Lamont et al.,1995) que relataram a presença da bactéria apenas no citoplasma de células epiteliais gengivais.

Assim, é possível que a manutenção de *P. gingivalis* na placenta esteja relacionada aos maiores níveis de IL-10, de maneira similar ao que ocorre com *Salmonella entérica* (Noto et al., 2014), e este organismo estaria favorecido pelos maiores níveis de IL-10 na placenta dos animais infectados. De maneira análoga ao observado para *P. gingivalis*, a inoculação de *S. enterica* no 15º dia da gestação mostrou que a infecção pode gerar efeitos adversos ao padrão da gestação em camundongos como baixo peso ao nascimento, além de que a expressão de IFN-γ, TNF-α e IL-10 estavam aumentadas em resposta a *Salmonella*, não apenas em placenta, mas em líquido amniótico e em soro materno (Noto et al., 2014).

Partos pré-maturos estão também associados ao aumento da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, o que induz a síntese de prostaglandinas na placenta, induzindo assim o parto pré-termo (Kramer et al., 2009).

No presente estudo, foram observados maiores níveis placentários de IL-12 nos animais infectados. IL-12 está envolvida nas células NK uterinas, responsáveis pela desevolvimento da vascularização uterina. Polimorfismos nos genes de produção desta citocina podem modificar o balanço destas citocinas, o que pode resultar em aumento na susceptibilidade de abortos espontâneos (Ostojić et al., 2007). Assim, os dados do presente estudo sugerem que o aumento dos níveis de IL-12p40 e IL-12p70 nas placentas dos animais teste, infectados com *P. gingivalis*, pode ter afetado o desenvolvimento fetal, o que resultou em alterações no padrão gestacional, como baixo peso ao nascer dos fetos.

No presente estudo foram observados maiores níveis placentários de TNF-α (não significante) e de IFN-γ no grupo infectado. Estes dados estão de acordo com o quadro encontrado de alterações no perfil gestacional, como baixo peso de fetos e menor ganho de peso materno. TNF-α induz a produção de metaloproteinases da matriz por macrófagos promovendo o enfraquecimento da membrana placentária e liberação de prostaglandina E2, que induz a contração uterina (Chaouat et al.,1995).

A administração de TNF-α e IFN-γ em ratas grávidas aumenta a prevalência de aborto fetal e anomalias fetais, tais como redução do peso fetal e atraso de desenvolvimento do olho (Vassiliadis et al., 1994).

Também foram observados maiores níveis placentários de GM-CSF nos animais infectados com *P. gingivalis* do que no controle. GM-CSF é uma citocina hematopoiética com efeitos sobre a sobrevivência, proliferação e diferenciação de leucócitos. Os níveis de GM-CSF apresentam-se elevados no líquido amniótico de animais que sofreram invasão microbiana na cavidade amniotica em comparação aos controles não infectados (Kacerovsky et al., 2013). Membranas placentárias coletadas de pacientes que tiveram rompimento de membrana placentária antes da concepção mostraram aumento dos níveis de GM-CSF do que membranas coletadas após o momento da concepção (Gomez-Lopez et al., 2014) indicando que existe uma relação entre esta citocina e infecções na gestação e alterações gestacionais.

Os níveis placentários de IL-1β também encontraram-se aumentados nos animais infectados com *P. gingivalis* em relação ao controle. Em placentas de mulheres saudáveis ocorre regulação negativa da expressão de IL-1β em consequência do aumento de detritos trofoblásticos, seguidos de fagocitose das microvesículas (Abumaree et al., 2012). Por outro lado, os níveis séricos desta citocina foram inversamente associados com a redução da probabilidade de se desenvolver pré-eclâmpsia, pré-eclâmpsia a termo e pré-eclâmpsia pré-termo (Mosimann et al., 2013).

Assim, os dados do presente estudo permitem concluir que a infecção oral prolongada por *P. gingivalis* é associada não somente a perda óssea alveolar, mas também pode promover alterações sistêmicas, como alterações no perfil gestacional, que são associadas à infecção pelo patógeno da unidade feto-placentária e alterações no perfil de citocinas placentárias.

Apesar dos dados epidemiológicos revelarem associação, positiva entre periodontite e alterações gestacionais, esta associação ainda é controversa (para revisão , veja Zi et al., 2015). A dificuldade dos estudos populacionais envolve múltiplos fatores, entre eles o número de mulheres em fase fértil com periodontite severa. A periodontite crônica severa afeta principalmente indivíduos com mais de 50 anos, portanto além do período de maior fertilidade na mulher. Por outro lado, a periodontite agressiva, associada a *A.actinomycetemcomitans* (Carrouel et al., 2016)

afeta também indivíduos jovens. Assim, optamos por também analisar o efeito da infecção experimental por *A.actinomycetemcomitans* sobre o padrão gestacional.

Dados prévios deste laboratório indicaram que a colonização de longa duração em camundongos por *A.actinomycetemcomitans* não foi alcançada (dados não mostrados). Embora vários estudos tenham testado o modelo de infecção oral para avaliar o efeito de *A.actinomycetemcomitans* na cavidade oral (Ashigaki et al., 2013; Izawa et al., 2014; Madeira et al., 2013), a maioria destes estudos avaliou a resposta imune à infecção num período menor do que o necessário para permitir o acompanhamento durante todo o período de prenhez. A infecção oral com *A.actinomycetemcomitans* em camundongos leva ao aumento da inflamação devido à inibição da função de Treg resultando em perda de osso alveolar (Garlet et al., 2010), mediada pela resposta imune Th1 e Th17, o que promove um infiltrado inflamatório nos tecidos gengivais. No entanto, esta é seguida por um período de reparo, quando as células Th2 (T CD4 + IL4 +) e Treg (CD4 + FoxP3 +) migram para o tecidos periodontais (Araujo-Pires et al., 2015). Embora esses estudos não tenham avaliado a colonização oral por *A.actinomycetemcomitans*, parece plausível que o hospedeiro seja capaz de eliminar a infecção oral por *A. actinomycetemcomitans* em camundongos, diferindo da colonização de longa duração em humanos.

Deve ser ressaltado também que o modelo experimental de infecção experimental por *A. actinomycetemcomitans* em camundongos é dificultado pois alguns fatores de virulência de *A. actinomycetemcomitans* como a leucotoxina e a adesina Aae têm especificidade por células humanas e de outros animais, não sendo efetivas em células de camundongos.

A leucotoxina produzida por *A. actinomycetemcomitans* é considerada o fator chave da sua virulência. Em altas doses, *ltxA* destrói células pela formação de poros na membrana causando necrose, enquanto menores doses, provavelmente mais fisiologicamente representativas, induzem a apoptose (Korostoff et al., 1998, 2000). A leucotoxina, pertencente à família de toxinas RTX, caracteriza-se por apresentar especificidade para leucócitos polimorfonucleares, monócitos, células leucêmicas, células linfoides e macrófagos (Lally et al., 1996; Narayanan et al., 2002). Uma característica única do *ltxA* é a alta especificidade para células de humanos e primatas do velho mundo (Simpson et al., 1988; Taichman et al., 1980,1987), e devido a essa especificidade, a contribuição deste fator de virulência

não pode ser testada em modelos animais de roedores (Baker et al., 2002; Evans et al., 1992; Graves et al., 2008; Lalla et al., 2003; Lee et al., 2009; Niederman et al., 2002; Polak et al., 2009; Schreiner et al., 2003).

Todos os isolados de *A. actinomycetemcomitans* apresentam o operon *ltx*, que codifica a leucotoxina, mas diferenças na região do promotor *ltx* levam a diferenças na sua expressão. O operon *ltx* de isolados produtores de altos títulos de leucotoxina (*JP2-like*) apresenta uma deleção de 530 pares de base, resultando em 10-20 vezes maior expressão de leucotoxina do que as cepas de baixa leucotoxidade (Brogan et al., 1994; Zambon et al., 1988). *A. actinomycetemcomitans* cepa JP2 é caracterizada por sua alta virulência e atividade leucotóxica (Dileepan et al., 2007; Haubek et al., 2007; Henderson et al., 2003). Assim, no presente estudo, optamos por avaliar o efeito de uma cepa do clone JP2. Mesmo que as células de camundongos não sejam suscetíveis à leucotoxina de *A.actinomycetemcomitans*, foi demonstrado que o clone JP2 apresenta outros genes oriundos de transmissão horizontal que poderiam colaborar com a sua virulência (Hwang et al., 2014).

Um outro fator que poderia dificultar a colonização por *A.actinomycetemcomitans* em modelo murino é a adesina Aae. Esta adesina é parcialmente responsável pela adesão a células epiteliais (Yue et al., 2007), e tem como alvo estreita gama de hospedeiros que inclui epitélio bucal de humanos, vacas e ratos (Fine et al., 2005). Por outro lado, a colonização por essa espécie não depende exclusivamente de Aae, sendo as fímbrias relacionadas a colonização das superfícies duras e formação de biofilmes (Fine et al., 2001), enquanto a adesão a células epiteliais é mediada também por outras proteínas de superfície como OMP 100 (Yue et al., 2007) e OMP29 (Kajiya et al., 2011).

Assim, optamos por usar uma amostra do clone JP2 recém isolada, fimbriada. Isolados clínicos de *A. actinomycetemcomitans* apresentam morfologia colonial rugosa com centro estrelar e aderem firmemente às superfícies, com formação de biofilmes densos, enquanto as cepas mantidas no laboratório perdem as fímbrias e formam colonias lisas no ágar (Fine et al., 1999). A aderência não específica e autoagregação de *A. actinomycetemcomitans* estão associadas à

presença de fimbrias (Kachlany et al., 2000) e cepas de *A. actinomycetemcomitans* aderentes induzem uma destruição tecidual mais acentuada em modelo experimental em ratos do que as amostras lisas (Fine et al., 2001; Schreiner et al., 2003).

A escassez de estudos experimentais sobre os efeitos sistêmicos da infecção por *A. actinomycetemcomitans* refere-se à dificuldade do modelo experimental de indução de periodontite. A maior parte dos modelos experimentais mostrou que a infecção oral em camundongos é facilitada em animais com deficiências ou condições que favoreçam a colonização. Por exemplo, a infecção experimental via oral por *A. actinomycetemcomitans* é maior em camundongos diabéticos do que em animais controle (Alabdulmohsen et al., 2015).

Embora para avaliar o papel de *P. gingivalis* na gestação tenhamos usado o modelo experimental de periodontite, para *A. actinomycetemcomitans* optamos por empregar o modelo de infecção intravenosa empregado por Tuomainen et al., 2008, No ensaio com *A. actinomycetemcomitans,* avaliamos a presença da bactéria em sangue total, no soro, placenta e fetos, visto que o modelo empregado foi diferente do modelo experimental com *P. gingivalis.* Na periodontite, os patógenos orais podem ter acesso intermitente á corrente sanguínea através da bolsa periodontal e da gengiva inflamada. No presente estudo, não foi induzida periodontite por *A. actinomycetemcomitans*, mas o patógeno foi inoculado intravenosamente, mimetizando bacteremias transitórias (Tuomainen et al., 2008).

Os animais receberam a bactéria viável nos 3º, 5º, 7º, 11º e 15º dias de prenhez, mimetizando sucessivas bacteremias ao longo de toda a gestação. Observamos então a presença do DNA da bactéria por qPCR em todos os animais do grupo teste, em pelo menos uma amostra, sendo 2/7 de amostras de sangue, 2/7 de soro, 11/14 de placenta, 12/18 de fetos e 1/6 de líquido amniótico.

Os dados indicam que *A. actinomycetemcomitans* é capaz de atravessar a barreira placentária e infectou a placenta. Este dado é inédito, pois não foram encontrados relatos do efeito deste organismo sobre a gestação.

Existem poucos dados sobre as repercussões sistêmicas da infecção por *A. actinomycetemcomitans* (Alabdulmohsen et al., 2015; Chen et al., 1996; Garley et

al., 2007; Hyvarien et al., 2009; Kesavalu et al., 2002;). Outros estudos mostram que a inoculação iv de *A. actinomycetemcomitans* juntamente com *C. pneumonia* por via intranasal levou a disseminação de *A.actinomycetemcomitans* para órgãos como pulmão, fígado e coração (Hyvarien et al., 2009). Quando *A. actinomycetemcomitans* foi inoculado subcutâneamente em modelo murino, evidenciou a formação de lesão local, a infecção também levou a aumento de linfócitos CD4. (Chen et al., 1996).

Os nossos dados estão também de acordo com estudos em humanos onde *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em sítios extra-orais. Este patógeno foi isolado a partir de vários tipos de infecções não orais como por exemplo, abcesso cerebral, endocardite, pericardite, pneumonia e septicemia (Henderson et al., 2003). Este organismo foi detectado em amostras de placa de ateroma, mostrando sua capacidade de colonizar sítios distantes (Calandrini et al., 2014). Além disso, *A. actinomycetemcomitans* é um dos membros do grupo HACEK, bactérias gram negativas anaeróbias facultativas capazes de induzir endocardite (Yew et al., 2014). Além disso, foi demostrado que a presença de *A. actinomycetemcomitans* na placa subgengival e em pessoas soropositivas para o patógeno, estão associadas a um maior risco de estenose da carótida e doença cardíaca coronária (Desvarieux et al., 2005).

Assim, a fim de avaliar os mediadores inflamatórios nos animais infectados, analisamos biomarcadores no soro, e placenta em animais infectados com *A. actinomycetemcomitans.*

Os dados indicaram que a infecção experimental por *A. actinomycetemcomitans* não induziu aumento significativo em citocinas séricas, apesar das contínuas inoculações durante a prenhez dos animais. Por outro lado, a análise de biomarcadores em placenta revelou aumento significativo de TNF-α, IL-4 e IL-6 no grupo infectado em relação ao controle.

Os níveis placentários de IL-6 também foram maiores em animais infectados por *A. actinomycetemcomitans* do que nos animais controle. IL-6 é produzida precocemente no processo inflamatório por monócitos e macrófagos, imediatamente após a estimulação de TLRs com padróes associados a patógenos distintos. (Janeway et al., 2002). Assim, a detecção de altos níveis de IL-6 na placenta dos animais infectados por *A. actinomycetemcomitans,* mas não daqueles infectados por

P. gingivalis pode ser decorrente de diferenças nos protocolos de infecção, e não necessariamente por diferenças nas espécies bacterianas.

IL-6 é produzida por várias céulas como células T, células B, monócitos, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. IL-6 sérica é raramente detectável em doadores saudáveis, mas atinge níveis circulantes altos durante episódios inflamatórios, entre 1–5 pg/mL a várias µg/mL em casos extremos. Consequentemente IL-6 é um dos mediadores da inflamação mais expressos (Chiesa et al., 2015). Durante a gestação, os níveis de IL-6 no líquido amniótico são os melhores preditores de parto-prematuro associado a inflamação intra-amniótica (Krupa et al., 2006; Vrachnis et al., 2012). Como relatado anteriormente, o papel de TNF-α sobre a gestação tem sido demonstrado. Estudos experimentais mostram que a inoculação com patógenos associados a alterações gestacionais no cervix de camundongos (Silva et al., 2016) induz aumento da produção de TNF-α e INF-γ.

A presença de patógenos como *Ureaplasma diversum* no trato reprodutivo durante a gravidez também tem sido associada com a ruptura prematura de membranas fetais mediadas por TNF-α e IL-6. Além disso, a infecção intra-uterina aumenta a produção de prostaglandinas, fator de necrose dos tecidos (TNF-α), interleucinas (IL-6 e IL-8), levando a mais frequentes e intensas contrações uterinas, que podem contribuir para o trabalho de parto prematuro (LeBlanc et al., 2012).

Estudos experimentais prévios mostram que a inoculação de *A. actinomycetemcomitans* via oral em ratos (Bezerra et al., 2012) induz aumento da expressão de TNF-α no epitélio juncional, indicando que este agente induz a produção desta citocina. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-α, estão presentes na maioria dos nascimentos prematuros (Marchioni, Lichtenstein, 2013). Além disso, os efeitos das células T citotóxicas e IFN-γ, TNF-α e IL - 2 poderem levar a danos e morte fetal placentária mediada pela destruição de sincício-trofoblastos. TNF-α é relatado como uma citocina embriotóxica, que induz a apoptose através de trofoblasto receptores do TNF, especialmente se a citocina é libertada por monócitos em contato direto com o trofoblasto (Chan, Guilbert, 2005). Como esclarecido anteriormente, estas citocinas estimulam a secreção de outros mediadores, incluindo prostaglandina E2 e metaloproteinases da matriz, que participam no enfraquecimento das membranas fetais e conseqüente rompimento dessa membrana (Estrada-Gutierrez et al., 2010).

O aumento de TNF-α e IL-6 na placenta de animais infectados por *A. actinomycetemcomitans* indica que a presença do patógeno em circulação estimula o sistema imune a responder contra a infecção, mas ao mesmo tempo poderia haver indução de alterações gestacionais. Este perfil de citocinas poderia promover baixo peso dos fetos, pois o enfraquecimento das membranas fetais promovidos por TNF-α e IL-6, poderia dificultar que nutrientes provenientes da mãe cheguem ao feto, alterando então o seu desenvolvimento. Os dados do presente estudo indicam que a bacteremia por A. *actinomycetemcomitans* pode levar a infecção da unidade fetoplacentária e alterar o perfil de citocinas na placenta. Além disso, fornecem subsídeos para a realização de outros protocolos, utilizando outros modelos animais, diferentes doses e formas de inoculação. No entanto, apesar da alteração no perfil de citocinas induzido por *A. actinomycetemcomitans*, a infecção experimental não induziu a alterações no padrão de gestação.

Um fator intrigante foi o aumento de IL-4 na placenta de animais infectados com *A. actinomycetemcomitans* e de IL-10 nos animais infectadas com *P. gingivalis,* como relatado anteriormente neste capítulo, devido as suas propriedades anti-inflamatórias. Várias células do sistema imune produzem IL-4, que não só media a função das células Th2, mas também desempenha um papel na regulação de Tregs que desempenham um papel importante na gravidez bem sucedida (Chatterjee et al., 2014). Tanto IL-4 e IL-10 mediam a sinalização entre as células do sistema imune e também regulam o recrutamento, ativação e a supressão de ambas as células imunes e não imunes. IL-4 é detectável na interface materno-fetal durante todas as fases da gravidez, sendo produzida não só por células do sistema imunológico da placenta, mas também da decídua materna, membranas amnio-coriônica, citotrofoblastos, e células endoteliais maternas e fetais (Chatterjee et al., 2014).

Como discutido anteriormente, o mecanismo de invasão é um fator de virulência de periodontopatógenos *Porphyromonas gingivalis e Aggregatibacter actinomycetencomitans* (Lamont, Yilmaz, 2002), e este mecanismo poderia ser favorecido por IL-10. No entanto, não foi observado aumento nos níveis de IL-10 nas placentas infectadas por *A. actinomycetemcomitans.* Além disso, é possível que este agente não fosse beneficado por IL-10.Embora *A. actinomycetemcomitans* seja capaz de invadir células epiteliais e fibroblastos, este organismo passa rapidamente de uma célula para outra em cultura de células em multicamadas (Meyer et al.,

1997). Além disso, a eficiência da invasão pode variar entre isolados de *A. actinomycetemcomitans* (Fives-Taylor et al., 1995) e o genótipo que representa o clone JP2, usado no presente estudo, geralmente não apresenta propriedades invasivas (Dirienzo et al., 2002; Lepine et al.,1998).

No presente estudo, existem diferenças não somente no periodontopatógeno utilizado, mas também nos modelos experimentais, quanto à via de inoculação e ao tempo decorrido do último desafio, o que dificulta a comparação. No entanto , em ambos os modelos observa-se uma alteração no perfil de citocinas, em direção a produção de fatores pró-inflamatórios como TNF-α, IL-1β e IL-12. Por outro lado, os níveis de mediadores anti-inflamatórios como IL-10, IL-4 e IL-6 também foram maiores nos grupos infectados que controle,em ambos os modelos.

Os dados do presente estudo sugerem que *P. gingivalis* exerce maior efeito sobre a gestação do que *A. actinomycetemcomitans*. No entanto, esta observação não pode ser confirmada apenas por este estudo, pois diferentes protocolos de indução de infecção foram empregados. Outros estudos mostram que a virulência de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* parece diferir não apenas pela sua associação a diferentes doenças periodontais em humanos, mas também em modelos experimentais. Em modelo *in vivo* murino de calvária foram avaliados os efeitos de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* sobre a expressão de três citocinas pró-inflamatórias envolvidos em reabsorção óssea (Kesavalu et al., 2002). Este estudo mostrou regulação positiva de TNF-α seguida por IL-1β e IL-6 nos sítios infectados em relação ao controle, mas *P. gingivalis* foi mais efetivo do que *A. actinomycetemcomitans* em induzir a expressão de citocinas.

6 Conclusão

Com base na metodologia empregada no presente estudo, podemos concluir que:

A infecção experimental por gavagem oral com *P. gingivalis*

- promoveu destruição do osso alveolar, portanto, induzindo à periodontite.
- promoveu a colonização de sítios orais, como biofilme dental e tecido gengival, e sítios extra-orais como intestino e fígado. A bactéria ultrapassou a barreira fetoplacentária e colonizou a unidade placentária, sendo detectada em fetos, placentas e líquido amniótico.
- promoveu alterações no padrão de prenhez, levando a menor peso dos fetos e menor ganho de peso materno durante a prenhez, mas não alterou o número de fetos ou induziu a reabsorções fetais.
- não promoveu alterações nos níveis séricos ou no tecido gengival de mediadores inflamatórios (IL-1-β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17α, TNF-α, GM-CSF, IFN-γ, IL-12 p40 e IL-12p470), 42 dias após a última inoculação com o agente.
- promoveu aumento dos níveis placentários de IL-1β , INF-γ, IL-10, GMCSF, IL-12p40 e IL-12p70.

Os dados indicam que a infecção oral por *P. gingivalis* promove não somente a destruição dos tecidos periodontais, mas o organismo é capaz de alcançar sítios extra-orais, ultrapassar a barreira placentária, e colonizar a unidade feto-placentária, alterar o perfil de mediadores inflamatórios na placenta, resultando em baixo peso fetal.

A infecção experimental com *A. actinomycetemcomitans*:

- permitiu que a bactéria ultrapassasse a barreira fetoplacentária e promoveu colonização da unidade placentária, sendo detectada em fetos, placentas e líquido amniótico.
- não promoveu alterações no padrão de prenhez, não alterando o número e o peso dos fetos, o ganho de peso materno, e não promovendo reabsorções fetais.

- não promoveu alterações nos níveis séricos de mediadores inflamatórios (IL-4, IL-6, TNF-α, IFN-γ).
- promoveu aumento dos níveis placentários de IL-4, IL-6 e TNF-α,mas não alterou os níveis de IFN-γ.

Os dados indicam que *A. actinomycetemcomitans* é capaz de ultrapassar a barreira placentária e colonizar a unidade feto-placentária, resultando em alteração no perfil de mediadores inflamatórios na placenta.

Em conjunto, os nossos resultados sugerem que a associação entre periodontite e alterações gestacionais pode ser explicada pela capacidade de patógenos periodontais como *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* ultrapassar a barreira placentária, colonizar e aumentar a produção de mediadores inflamatórios na unidade fetoplacentária, alterando assim o equílibrio imunológico, essencial para o sucesso da gestação.

Referências*

Abumaree MH, Chamley LW, Badri M, El-Muzaini MF. Trophoblast debris modulates the expression of immune proteins in macrophages: a key to maternal tolerance of the fetal allograft? J Reprod Immunol. 2012;94(2):131-41.

Aida Y, Kusumoto K, Nakatomi K, Takada H, Pabst MJ, Maida K. An analogue of lipid A and LPS from Rhodobacter sphalioides inhibits neutrophil responses to LPS by blocking receptor recognition of LPS and by depletind LPS- binding protein in plasma. J. Leukoc Biol.1995;58: 675-82.

Alabdulmohsen W, Rozario SD, Markowitz K, Fine DH, Velliyagounder K. Diabetic Lactoferrin Deficient Mice Demonstrates Greater Susceptibility to Experimental Periodontal Disease. J Oral Biol (Northborough). 2015;2(2)

Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and periodontal health status. J Dent Res. 2000;79(9):1664-8.

Ando-Suguimoto ES, da Silva MP, Kawamoto D, Chen C, DiRienzo JM, Mayer MP. The cytolethal distending toxin of Aggregatibacter actinomycetemcomitans inhibits macrophage phagocytosis and subverts cytokine production. Cytokine. 2014; 66(1):46-53.

Ao M, Miyauchi M, Furusho H, Inubushi T, Kitagawa M, Nagasaki A, Sakamoto S, Kozai K, Takata T, Dental Infection of Porphyromonas gingivalis Induces Preterm Birth in Mice. PLoS One. 2015;31;10(8):e0137249

Araujo-Pires AC, Vieira AE, Francisconi CF. Biguetti CC, Glowacki A, Yoshizawa S, Campanelli AP, Trombone AP, Sfeir CS, Little SR, Garlet GP. IL-4/CCL22/CCR4 axis controls regulatory T-cell migration that suppresses inflammatory bone loss in murine experimental periodontitis. J Bone Miner Res. 2015;30:412-422.

Arimatsu, K. et al. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. Sci. Rep. 2014;4: 4828.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal dis- eases and conditions. Ann Periodontol. 1999;4(1):1–6.

Ashigaki N, Suzuki J, Aoyama N, Ogawa M, Watanabe R, Kobayashi N, Komuro I, Izumi Y, Isobe M. The periodontal pathogen Aggregatibacter actinomycetemcomitans affects experimental autoimmune myocarditis in mice. Int Heart J. 2013;54(6):412 6.

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Ayub LG, Novaes J, Belém A, Grisi MFM, Souza LSL, Palioto DB. Stress as possible risk factor for periodontal disease - literature review. R. Periodontia. 2010;20:28-36.

Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Roopenian DC. Heterogeneity of Porphyromonas gingivalis strains in the induction of alveolar bone loss in mice. Oral Microbiol Immunol. 2000;15(1):27-32.

Baker PJ, Howe L, Garneau J, Roopenian DC. T cell knockout mice have diminished alveolar bone loss after oral infection with Porphyromonas gingivalis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002;6;34(1):45-50.

Bartova J, Linhartova PB, Podzimek S, Janatova T, Svobodova K, Fassmann A, Duskova J, Belacek J, Holla LI.The effect of IL-4 gene polymorphisms on cytokine production in patients with chronic periodontitis and in healthy controls. Mediators Inflamm. 2014;2014:185757.

Belanger M, Reyes L, von Deneen K, Reinhard MK, Progulske-Fox A, Brown MB. Colonization of maternal and fetal tissues by Porphyromonas gingivalis is strain-dependent in a rodent animal model. Am J Obstet Gynecol. 2008;199: 86.e1–86.e7.

Bezerra Bde B, Andriankaja O, Kang J, Pacios S, Bae HJ, Li Y, Tsiagbe V, Schreiner H, Fine DH, Graves DT. A.actinomycetemcomitans-induced periodontal disease promotes systemic and local responses in rat periodontium. J Clin Periodontol. 2012; 39(4):333-41.

Brogan JM, Lally ET, Poulsen K, Kilian M, Demuth DR. Regulation of Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. Infect Immun. 1994;62(2):501-8.

Bueno LC, Mayer MP, DiRienzo JM. Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis-susceptible children from health to disease and Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin promoter structure. J Periodontol.1998; 69(9):998-1007.

Calandrini CA, Ribeiro AC, Gonnelli AC, Ota-Tsuzuki C, Rangel LP, Saba-Chujfi E, Mayer MP. Microbial composition of atherosclerotic plaques. Oral Dis. 2014; 20(3):e128-34.

Carrillo-de-Albornoz A, Figuero E, Herrera D, Bascones-Martínez A. Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the sub- gingival biofilm. J Clin Periodontol. 2010;37(3):230–40.

Carrouel F, Viennot S, Santamaria J, Veber P, Bourgeois D. Quantitative Molecular Detection of 19 Major Pathogens in the Interdental Biofilm of Periodontally Healthy Young Adults. Front Microbiol. 2016;2;7:840.

Chan, Gand Guilbert LJ. Enhanced monocyte binding to human cytomegalovirus-infected syncytiotrophoblast results in increased apoptosis via the release of tumour necrosis factor alpha. J Pathol. 2005;207: 462-470.

Chaouat G, Menu E, Delage G, Moreau JF, Khrishnan L, Hui L, Meliani AA, Martal J, Raghupathy R, Lelaidier C, et al. Immuno-endocrine interactions in early pregnancy. Hum Reprod. 1995;10 Suppl 2:55-9.

Chatterjee P, Chiasson VL, Bounds KR, Mitchell BM. Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. Front Immunol. 2014;27;5:253.

Chen PB, Davern LB, Katz J, Eldridge JH, Michalek SM. Host responses induced by co-infection with Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans in a murine model. Oral Microbiol Immunol.1996;11(4):274-81.

Chiesa C, Pacifico L, Natale F, Hofer N, Osborn JF, Resch B. Fetal and early neonatal interleukin-6 response. Cytokine. 2015;76(1):1-12

Daneva AM, Hadži-Lega M, Stefanovic M. Correlation of the system of cytokines in moderate and severe preeclampsia. Clin Exp Obstet Gynecol. 2016;43(2):220-4.

Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. Nat Rev Microbiol. 2010;8(7):481–90.

Delima AJ, Oates T, Assuma R, Schwartz Z, Cochran D, Amar S, Graves DT. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. J Clin Periodontol. 2001; 28(3):233-40.

de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, Cirelli JA. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. J Periodontol. 2014;85(3):465-77.

Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR Jr, Sacco RL, Papapanou PN. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST).Circulation. 2005; 111: 576–582.

DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. Semin Fetal Neonatal Med. 2012; 17(1):2–11

Di Rienzo JM, Song M, Wan LSY, Ellen RP. Kinetics of KB and Hep-2 cell responses to an invasive, cytolethal distending toxin-producing strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Oral Microbiol. and Immunol. 2002;17:245-251.

Dileepan T, Kachlany SC, Balashova NV, Patel J, Maheswaran SK. Human CD18 is the functional receptor for Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin. Infect Immun. 2007;75(10):4851-6.

Ding T, Schloss P. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. Nature. 2014;15;509(7500):357-60

Estrada-Gutierrez G, Gomez-LopezN, Zaga-ClavellinaV, Giono-CerezoS, Espejel-NuñezA, Gonzalez-JimenezMA, Espino y Sosa S, OlsonDM and Vadillo-OrtegaF. Interaction between pathogenic bacteria and intrauterine leukocytes triggers alternative molecular signaling cascades leading to labor in women. Infect Immun. 2010;78:4792-4799.

Evans BD, Dilwith RL, Balaban SL, Rudofsky UH. Lack of passive transfer of renal tubulointerstitial disease by serum or monoclonal antibody specific for renal tubular antigens in the mouse. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1988;86(2):238-42.

Evans RT, Klausen B, Ramamurthy NS, Golub LM, Sfintescu C, Genco RJ. Periodontopathic potential of two strains of Porphyromonas gingivalis in gnotobiotic rats. Arch Oral Biol. 1992;37(10):813-9.

Figueras F, Figueras J, Meier E. Customized birthweight standards accu- rately predict perinatal morbidity. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2007;92(4):F277–80.

Fine DH, Furgang D, Kaplan J, Charlesworth J, Figurski DH. Tenacious. Tenacious adhesion of Actinobacillus actinomycetemcomitans strain CU1000 to salivary-coated hydroxyapatite. Arch Oral Biol. 1999;44(12):1063-76.

Fine DH, Goncharoff P, Schreiner H, Chang KM, Furgang D, Figurski D. Colonization and persistence of rough and smooth colony variants of Actinobacillus actinomycetemcomitans in the mouths of rats. Archives of Oral Biology. 2001;46: 1065–1078

Fine DH, Velliyagounder K, Furgang D, Kaplan JB. The Actinobacillus actinomycetemcomitans autotransporter adhesin Aae exhibits specificity for buccal epithelial cells from humans and old world primates. Infect Immun. 2005;73(4):1947-53.

Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz K. Characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. Adv. Dent. Res.1995;9(1).55-62.

Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. Clin Exp Immunol. 2007;147(1):128-38.

Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. J Dent Res. 2010; 89:1349-1363

Garlet GP, Cardoso CR, Mariano FS, Claudino M, de Assis GF, Campanelli AP, Avila-Campos MJ, Silva JS. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. J Clin Periodontol. 2010;37, 591-600.

Gibbs RS. The relationship between infections and adverse pregnancy out- comes: an overview. Ann Periodontol. 2001;6(1):153–63.

Gomez-Lopez N, StLouis D, Lehr MA, Sanchez-Rodriguez EN, Arenas-Hernandez M. Immune cells in term and preterm labor. Cell Mol Immunol. 2014;11(6):571-81.

Gonzales-Marin C, Spratt DA, Millar MR, Simmonds M, Kempley ST, Allaker RP. Levels of periodontal pathogens in neonatal gastric aspirates and possible maternal sites of origin. Mol Oral Microbiol. 2011;26(5):277-90.

Gowen M, Mundy GR .Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon-gamma on bone resorption *in vitro*. J Immunol. 1986;136:2478-82.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. J Periodontol . 2003;74:391-401

Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. Front Oral Biol. 2012;15:117-32.

Grenier D, Goulet V, Mayrand D. The capacity of Porphyromonas gingivalis to multiply under ironlimiting conditions correlates with its pathogenicity in an animal model. J Dent Res. 2001;80: 1678–1682.

Guleria I, Pollard JW. The trophoblast is a component of the innate immune system during pregnancy. Nat Med. 2000;6(5):589–93.

Gürsoy M, Pajukanta R, Sorsa T, Könönen E. Clinical changes in periodontium during pregnancy and post-partum. J Clin Periodontol. 2008;35(7):576–83.

Hajishengallis G Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nat Rev Immunol. 2015;15(1):30-44.

Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. Mol Oral Microbiol. 2012;27(6):409-19

Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Poulsen S, Benzarti N, Kilian M. Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of Actinobacillus actinomycetemcomitans. J Dent Res. 2001;80(6):1580-3.

Haubek D, Poulsen K, Kilian M. Microevolution and patterns of dissemination of the JP2 clone of Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans. Infect Immun. 2007;75(6):3080-8.

Haubek D. The highly leukotoxic JP2 clone of Aggregatibacter actinomycetemcomitans: evolutionary aspects, epidemiology and etiological role in aggressive periodontitis. APMIS Suppl. 2010;(130):1-53

Hellström U, Hallberg EC, Sandros J, Rydberg L, Bäcker AE. Carbohydrates act as receptors for the periodontitis-associated bacterium Porphyromonas gingivalis: a study of bacterial binding to glycolipids. Glycobiology. 2004;4(6):511-9

Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen Actinobacillus actinomycetemcomitans. Annu Rev Microbiol. 2003;57:29-55. Review.

Heng YJ, Liong S, Permezel M, Rice GE, Di Quinzio MK, Georgiou HM.Human cervicovaginal fluid biomarkers to predict term and preterm labor. Front Physiol. 2015;13;6:151.

Heng YJ, Pennell CE, Chua HN, Perkins JE, Lye SJ. Whole blood gene expression profile associated with spontaneous preterm birth in women with threatened preterm labor. PLoS ONE . 2014;9:e96901

Hirata R Jr, Ménard C, Fournier D, Catellani MA, Mouton C, Ferreira MC. Isolation of Porphyromonas gingivalis strain from tubal-ovarian abscess. J Clin Microbiol.1995; 33(7):1925-6.

Hokamura K, Inaba H, Nakano K, Nomura R, Yoshioka H, Taniguchi K, Ooshima T, Wada K, Amano A, Umemura K. Molecular analysis of aortic intimal hyperplasia caused by Porphyromonas gingivalis infection in mice with endothelial damage. J Periodontal Res. 2010;45(3):337-44.

Holzhausen M, Spolidorio LC, Ellen RP, Jobin MC, Steinhoff M, Andrade-Gordon P, Vergnolle N. Protease-activated receptor-2 activation: a major role in the pathogenesis of Porphyromonas gingivalis infection. Am J Pathol. 2006; 168(4):1189-99.

Horliana AC, Chambrone L, Foz AM, Artese HP, Rabelo Mde S, Pannuti CM. Dissemination of periodontal pathogens in the bloodstream after periodontal procedures: a systematic review. PLoS One. 2014;28;9(5):e98271

Huang Y, Kittichotirat W, Mayer MP, Hall R, Bumgarner R, Chen. Comparative genomic hybridization and transcriptome analysis with a pan-genome microarray reveal distinctions between JP2 and non-JP2 genotypes of Aggregatibacter actinomycetemcomitans. C.Mol Oral Microbiol. 2013;28(1):1-17.

Huck O, Tenenbaum H, Davideau JL. Relationship between periodontal dis- eases and preterm birth: recent epidemiological and biological data. J Pregnancy. 2011; 2011:164654.

Hwang AM, Stoupel J, Celenti R, Demmer RT, Papapanou PN. Serum antibody responses to periodontal microbiota in chronic and aggressive periodontitis: a postulate revisited. J Periodontol. 2014;85(4):592-600.

Hyvärinen K, Tuomainen AM, Laitinen S, Bykov IL, Törmäkangas L, Lindros K, Käkelä R, Alfthan G, Salminen I, Jauhiainen M, Kovanen PT, Leinonen M, Saikku P, Pussinen PJ. Chlamydial and periodontal pathogens induce hepatic inflammation and fatty acid imbalance in apolipoprotein E-deficient mice. Infect Immun. 2009; 77(8):3442-9

Infante-Duarte C, Kamradt T. Th1/Th2 balance in infection. Springer Semin Immunopathol. 1999;21(3):317-38.

Ishihara Y, Nishihara T, Kuroyanagi T, Shirozu N, Yamagishi E, Ohguchi M, Koide M, Ueda N, Amano K, Noguchi T. Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. J Periodontal Res. 1997;32(6):524-9.

Izawa A, Ishihara Y, Mizutani H, Kobayashi S, Goto H, Okabe E, Takeda H, Ozawa Y, Kamiya Y, Sugita Y, Kubo K, Kamei H, Kikuchi T, Mitani A, Hayashi J, Nishihara T, Maeda H, Noguchi T. Inflammatory bone loss in experimental periodontitis induced by Aggregatibacter Infect Immun. 2014;82(5):1904-13

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol. 2002; 20:197-216

Kacerovsky M, Celec P, Vlkova B, Skogstrand K, Hougaard DM, Cobo T, Jacobsson B. Amniotic fluid protein profiles of intraamniotic inflammatory response to Ureaplasma spp. and other bacteria. PLoS One. 2013;8(3):e60399

Kachlany SC, Planet PJ, Bhattacharjee MK, Kollia E, DeSalle R, Fine DH, Figurski DH. Nonspecific adherence by Actinobacillus actinomycetemcomitans requires genes widespread in bacteria and archaea. J Bacteriol. 2000;182(21):6169-76.

Kajiya M, Komatsuzawa H, Papantonakis A, Seki M, Makihira S, Ouhara K, Kusumoto Y, Murakami S, Taubman MA, Kawai T. Aggregatibacter actinomycetemcomitans Omp29 is associated with bacterial entry to gingival epithelial cells by F-actin rearrangement. PLoS One. 2011;29;6(4):e18287.

Katz J., Chegini N, Shiverick KT, Lamont RJ. Localization of P. gingivalis in preterm delivery placenta. In J Dent Res. 2009;575–578

Katz J, Lee AC, Kozuki N, Lawn JE, Cousens S, Blencowe H, et al. Mortality risk in preterm and small-for-gestational-age infants in low-income and middle- income countries: a pooled country analysis. Lancet. 2013;382(9890):417–25.

Kawamoto D, Ando ES, Longo PL, Nunes AC, Wikström M, Mayer MP. Genetic diversity and toxic activity of Aggregatibacter actinomycetemcomitans isolates. Oral Microbiol Immunol. 2009;24(6):493-501.

Kesavalu L, Chandrasekar B, Ebersole JL. In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans. Oral Microbiol Immunol. 2002;17(3):177-80.

Klimova RR, Malinovskaia VV, Parshina OV, Guseva TS, Novikova SV, Tor- shina ZV, et al. The effect of viral infections on the cytokine profile in pregnant women with obstetric complications and immunotherapy with human alpha2b interferon. Vopr Virusol. 2013;58(1):18–23.

Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. Nat Rev Microbiol. 2010; 8(7):471–80.

Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Bäckhed HK, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during preg- nancy. Cell. 2012;150(3):470–80.

Kornman KS, Loesche WJ. Effects of estradiol and progesterone on Bac- teroides melaninogenicus and Bacteroides gingivalis. Infect Immun. 1982; 35(1):256–63.

Korostoff J, Wang JF, Kieba I, Miller M, Shenker BJ, Lally ET. Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. Infect Immun. 1998;66(9):4474-83.

Korostoff J, Yamaguchi N, Miller M, Kieba I, Lally ET. Perturbation of mitochondrial structure and function plays a central role in Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin-induced apoptosis. Microb Pathog. 2000;29(5):267-78.

Kramer BW, Kallapur S, Newnham J, Jobe AH. Prenatal inflammation and lung development. Semin Fetal Neonatal Med. 2009; 14(1):2-7.

Krishnan L, Guilbert LJ, Russell AS, Wegmann TG, Mosmann TR, Belosevic M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to Leishmania major infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines.J Immunol. 1996;156(2):644-52.

Krupa FG, Faltin D, Cecatti JG, Surita FG, Souza JP. Predictors of preterm birth. Int J Gynaecol Obstet. 2006;94(1):5-11.

Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA, Bucciarelli L, Jerud AP, Tucker S, Lu Y, Papapanou PN, Schmidt AM. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;1;23(8):1405-11.

Lally ET, Kerba IR, Ellis EG, Lear JD, Tanaka JC. Structure function aspects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. J Periodontol. 1996;67:298-308

Lamont RJ, Yilmaz Ö. In or out: the invasiveness of oral bacteria. Periodontol 2000 2002;30: 61-69.

Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. *Pophyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. Infect. Immun,1995; 63:3878-3885.

LeBlanc MM, Giguère S, Lester GD, Brauer K, Paccamonti DL Equine Vet J Relationship between infection, inflammation and premature parturition in mares with experimentally induced placentitis. Suppl. 2012;41:8-14

Lee SF, Andrian E, Rowland E, Marquez IC. Immune response and alveolar bone resorption in a mouse model of Treponema denticola infection. Infect Immun. 2009; 77(2):694-8.

Leon R, Silva N, Ovalle A, Chaparro, Ahumada A, Gajardo M, et al. Detection of Porphyromonas gingivalis in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. J Periodontol. 2007;78:1249–1255.

Lepine G, Caudry S, Di Rienzo JM, Ellen RP. Epithelial cell invasion by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain from restriction fragment-leunght polymorphism groups associated with juvenile perodontitis or carrier status. Oral Microbiol. Immunol. 1998;13(6):341-7.

Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of postmenopausal osteoporosis. J Dent Res. 2006; 85:596–607.

Li L, Messas E, Batista EL, Levine RA, Amar S. Porphyromonas gingivalis infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. Circulation. 2002;105:861–7.

Lin D, Smith MA, Champagne C, Elter J, Beck J, Offenbacher S. Porphyromonas gingivalis infection during pregnancy increases maternal tumor necrosis factor alpha, suppresses maternal interleukin-10, and enhances fetal growth restriction and resorption in mice. Infect Immun. 2003;71(9):5156-62.

Liu H, Redline RW, Han YW. Fusobacterium nucleatum induces fetal death in mice via stimulation of TLR4-mediated placental inflammatory response. J Immunol. 2007; 15;179(4):2501-8.

Madeira MF1, Queiroz-Junior CM, Costa GM, Werneck SM, Cisalpino D, Garlet GP, Teixeira MM, Silva TA, Souza DG. Platelet-activating factor receptor blockade ameliorates Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice. Infect Immun. 2013;81(11):4244-51

Mansheim BJ, Ondernon KAB, Kasper DL. Immunochemical and biologic studies of the lipopolysaccharide of Bacteroides melaninogenicus subspecies asaccharolyticus. J. Immunol. 1978;120:72-78.

Marchesan JT, Gerow EA, Schaff R, Taut AD, Shin SY, Sugai J, Brand D, Burberry A, Jorns J, Lundy SK, Nuñez G, Fox DA, Giannobile WV. Porphyromonas gingivalis oral infection exacerbates the development and severity of collagen-induced arthritis. Arthritis Res Ther. 2013;15(6):R186.

Marchioni RM and Lichtenstein GR. Tumor necrosis factor-α inhibitor therapy and fetal risk: a systematic literature review. World J Gastroenterol. 2013;19: 2591-2602.

Mayer MP, Bueno LC, Hansen EJ, DiRienzo JM. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun. 1999;67(3):1227-37.

Medawar PB, Hunt R. Can fetal antigens be used for prophylactic immunization? Ciba Found Symp. 1983;96:160-81.

Meyer DH, Mintz KP, Fives-Taylor PM. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis. Crit Rev Oral Biol Med. 1997; 8(4):389-409.

Michelin MC, Teixeira SR, Ando-Suguimoto ES, Lucas SR, Mayer MP. Porphyromonas gingivalis infection at different gestation periods on fetus development and cytokines profile. Oral Dis. 2012;18(7):648-54.

Mosimann B, Wagner M, Poon LC, Bansal AS, Nicolaides KH. Maternal serum cytokines at 30-33 weeks in the prediction of preeclampsia. Prenat Diagn. 2013; 33(9):823-30.

Narayanan SK, Nagaraja TG, Chengappa MM, Stewart GC. Leukotoxins of gram-negative bacteria. Vet Microbiol. 2002;4;84(4):337-56.

Nibali L, Farias BC, Vajgel A, Tu YK, Donos N. Tooth loss in aggres- sive periodontitis: a systematic review. J Dent Res. 2013;92(10):868–75.

Niederman R, Kelderman H, Socransky S, Ostroff G, Genco C, Kent R Jr, Stashenko P. Enhanced neutrophil emigration and Porphyromonas gingivalis reduction following PGG-glucan treatment of mice. Arch Oral Biol. 2002;47(8):613-8.

Nguyen T, Robinson N, Allison SE, Coombes BK, Sad S, et al. IL-10 produced by trophoblast cells inhibits phagosome maturation leading to profound intracellular proliferation of *Salmonella enterica* Typhimurium. Placenta. 2013;34: 765–74

Noto Llana M, Sarnacki SH, Aya Castañeda Mdel R, Pustovrh MC, Gartner AS, Buzzola FR, Cerquetti MC, Giacomodonato MN. Salmonella enterica serovar Enteritidis enterocolitis during late stages of gestation induces an adverse pregnancy outcome in the murine model. PLoS One. 2014; 3;9(11):e111282.

Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. J Periodontol. 1996;67(10 Suppl):1103–13

Ostojić S, Volk M, Medica I, Kapović M, Meden-Vrtovec H, Peterlin B. Polymorphisms in the interleukin-12/18 genes and recurrent spontaneous abortion. Am J Reprod Immunol. 2007;58(5):403-8.

Pejcic-Karapetrovic B, Gurnani K, Russell MS, Finlay BB, Sad S, et al. Pregnancy impairs the innate immune resistance to *Salmonella typhimurium* leading to rapid fatal infection. J Immunol. 2007;179: 6088–96.

Perez-Chaparro PJ, Gracieux P, Lafaurie GI, DonnioPY,Bonnaure-Mallet M Genotypic characterization of Porphyromonas gingivalis isolated from subgingival plaque and blood sample in positive bacteremia subjects withperiodontitis. J ClinPeriodontol. 2008;35: 748–753.

Piccinni MP, Scaletti C, Maggi E, Romagnani S. Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. J Neuroimmunol. 2000;109(1):30–3.

Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI, Houri-Haddad Y. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response. J Clin Periodontol. 2009;36(5):406-10.

Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. Immunol Today. 1997;8(10):478-82.

Raghupathy R Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. Semin Immunol. 2001;13(4):219-27.

Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclamp- sia. Med Princ Pract. 2013;22(Suppl 1):8–19.

Raposo, S B. Gingipaína e lipopolissacarídeo de Porphyromonas gingivalis promovem o elo entre inflamação e imunidade adaptativa vai receptores de cininas do subtipo B_2. Dissertação (Mestrado). Rio de Janeiro: Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Rio e Janeiro, 2007.

Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. Science. 2005;10;308(5728):1592-4.

Roberts FA, Richardson GJ, Michalek SM. *Effects of Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharides on mononuclear phagocytes. Infect Immun. 1997;65(8):3248-54.

Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. Science. 2014;345(6198):760–5

Rowe JH, Ertelt JM, Aguilera MN, Farrar MA, Way SS Foxp3(+) regulatory T cell expansion required for sustaining pregnancy compromises host defense against prenatal bacterial pathogens. Cell Host Microbe. 2011;10: 54–64

Rudney JD, Chen R, Pan Y. Endpoint quantitative PCR assays for Bacteroides forsythus, Porphyromonas gingivalis, and Actinobacillus actinomycetemcomitans. J Periodontal Res. 2003;38(5):465-70

Sandros J, Papapanou PN, Dahlén G. *Porphyromonas gingivalis* invades oral epithelial cells in vitro. J. Periodontal Res. 1993;28,219-226.

Schreiner HC, Sinatra K, Kaplan JB, Furgang D, Kachlany SC, Planet PJ, Perez BA, Figurski DH, Fine DH. Tight-adherence genes of Actinobacillus actinomycetemcomitans are required for virulence in a rat model. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;10;100(12):7295-300.

Schreiner H, Li Y, Cline J, Tsiagbe VK, Fine DH. A comparison of Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa) virulence traits in a rat model for periodontal disease. PLoS One. 2013;23;8(7):e69382

Shaddox LM, Wiedey J, Calderon NL, Magnusson I, Bimstein E, Bidwell JA, Zapert EF, Aukhil I, Wallet SM. Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis. J Dent Res. 2011;90(9):1140-4.

Shenker BJ, Hoffmaster RH, McKay TL, Demuth DR. Expression of the cytolethal distending toxin (Cdt) operon in Actinobacillus actinomycetemcomitans: evidence that the CdtB protein is responsible for G2 arrest of the cell cycle in human T cells. J Immunol. 2000; 1;165(5):2612-8.

Shusterman A, Salyma Y, Nashef A, Soller M, Wilensky A ,Mott R, mWeissE I , Houri-Haddad Y, Iraqi FA . Genotype is an important determinant factor of host susceptibility to periodontitis in the Collaborative Cross and inbred mouse populations BMC Genetics. 2013;14:68.

Silva JR, Ferreira LF, Oliveira PV, Nunes IV, Pereira ÍS, Timenetsky J, Marques LM, Figueiredo TB, Silva RA. Intra-uterine experimental infection by Ureaplasma diversum induces TNF-α mediated womb inflammation in mice. An Acad Bras Cienc. 2016;88 Suppl 1:643-52

Sobel JD. Gynecologic infections in human immunodeficiency virus-infected women. Clin Infect Dis. 2000;31(5):1225–33.

Szarka A, Rigó J Jr, Lázár L, Beko G, Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. BMC Immunol. 2010;2;11:59.

Taichman NS, Dean RT, Sanderson CJ. Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun. 1980;28(1):258-68.

Taichman NS, Simpson DL, Sakurada S, Cranfield M, DiRienzo J, Slots J. Comparative studies on the biology of Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin in primates. Oral Microbiol Immunol. 1987;2(3):97-104.

Teixeira SRL, Mattarazo F, Feres M, Figueiredo LC, de Faveri M, Simionato MRL, Mayer MPA. Quantification of Porphyromonas gingivalis and fimA genotypes in smoker chronic periodontitis. J ClinPeriodontol. 2009;36: 482–487

Tran SD, Rudney JD. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. J Clin Microbiol. 1996;34(11):2674-8.

Tuomainen AM, Jauhiainen M, Kovanen PT, Metso J, Paju S, Pussinen PJ. Aggregatibacter actinomycetemcomitans induces MMP-9 expression and proatherogenic lipoprotein profile in apoE-deficient mice. Microb Pathog. 2008; 44(2):111-7.

Ulevitch RJ. Therapeutics targeting the innate immune system. Nature Rev Immunol 4. 2004;512–520

van der Ploeg JR, Giertsen E, Lüdin B, Mörgeli C, Zinkernagel AS, Gmür R. Quantitative detection of Porphyromonas gingivalis fimA genotypes in dental plaque. FEMS Microbiol Lett. 2004;232(1):31-7.

Vassiliadis S, Tsoukatos D, Athanassakis. Interferon-. I induced class II expression at the spongiotrophoblastic zone of the murine placenta is linked to fetal rejection and developmental abnormalities. Acta Physiol Scand. 1994;151(4):485-95.

Vrachnis N, Karavolos S, Iliodromiti Z, Sifakis S, Siristatidis C, Mastorakos G, Creatsas G. Review: Impact of mediators present in amniotic fluid on preterm labour. In Vivo. 2012;26(5):799-812.

Wahlfors J, Meurman JH, Väisänen P, Alakuijala P, Korhonen A, Torkko H, Jänne J. Simultaneous detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis by a rapid PCR method.. J Dent Res. 1995;74(11):1796-801.

Waldorf KMA, McAdams RM. Influence of infection during pregnancy on fetal development. Reproduction. 2013;146(5):R151–62.

Wang M, Krauss JL, Domon H, Hosur KB, Liang S, Magotti P, Triantafilou M, Triantafilou K, Lambris JD, Hajishengallis G. Microbial hijacking of complement-toll-like receptor crosstalk. Sci Signal. 2010;16;3(109):ra11

Wang WJ, Liu FJ, Xin L, Hao CF, Bao HC, Qu QL, et al. Adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ regulatory T cells reverses the increase in abortion rate caused by interleukin 17 in the CBA/JxBALB/c mouse model. *Hum Reprod*. 2014;29(5):946–52.

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunol Today. 1993;14(7):353–6.

Wingrove JA, DiScipio RG, Chen Z, Potempa J, Travis J, Hugli TE. Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis. J Biol Chem.1992;15;267(26):18902-7

WHO. (2013). Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9280638327.pdf?ua=1

Xiong X, Buekens P, Fraser WD, Beck J, Offenbacher S. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: a systematic review. BJOG . 2006;113(2):135–43.

Yalcin F, Eskinazi E, Soydine M, Basegmez, C, Issever H. The effect of sociocultural status on periodontal condictions in pregnancy. J Periodontol. 2002;73:178-182.

Yew HS, Chambers ST, Roberts SA, Holland DJ, Julian KA, Raymond NJ, Beardsley J, Read KM, Murdoch DR. Association between HACEK bacteraemia and endocarditis. J Med Microbiol. 2014;63(Pt 6):892-5.

Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, Mawatari H, Imajo K, Nomura R, Hokamura K, Ono M, Murata S, Tohnai I, Sumida Y, Shima T, Kuboniwa M, Umemura K, Kamisaki Y, Amano A, Okanoue T, Ooshima T, Nakajima A. Involvement of a periodontal pathogen, Porphyromonas gingivalis on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. BMC Gastroenterol. 2012;16;12:16.

Yue G, Kaplan JB, Furgang D, Mansfield KG, Fine DH. A second Aggregatibacter actinomycetemcomitans autotransporter adhesin exhibits specificity for buccal epithelial cells in humans and Old World primates. Infect Immun. 2007;75(9):4440-8.

Zambon JJ, Umemoto T, De Nardin E, Nakazawa F, Christersson LA, Genco RJ. Actinobacillus actinomycetemcomitans in the pathogenesis of human periodontal disease. Adv Dent Res. 1988;2(2):269-74.

Zenclussen AC. Adaptive immune responses during pregnancy. Am J Reprod Immunol. 2013;69(4):291–303.

Zi MY, Longo PL, Bueno-Silva B, Mayer MP. Mechanisms Involved in the Association between Periodontitis and Complications in Pregnancy. Front Public Health. 2015; 29;2:290.

Anexos

A - Valores das médias e desvio padrão das cópias do gene 16SrRNA P.gingivalis encontrada em cada amostra de cada animal estudado.

Animais teste	sangue	soro	tecido gengival	biofilme	Intestino
312	273,9	0	0	0	0
322	108,43	184,18	0	646,18	0
362	52,99	153,11	13,56	322,8	0
343	0	7,53	0	0	0
314	0	0	0	0	0
324	0	0	0	0	17936174,04
364	13,75	0	0	0	0
374	0	0	0	2,2	0
3124	5,27	0	0	3,91	0
Média	50,48	38,31	1,50	108,34	1992908,2
Desvio padrao	91,42	74,33	4,52	228,06	5978724,68
fezes	figado	feto1	feto 2	feto 3	média de Pg encontrada nos fetos
0	13749.41	0	1608.79	4642.27	2083.68
34.21	39.21	109.04	0	0	36.34
0	0	12.25	0	0	4.083
0	0	0	0	0	0
0	28.85	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	1.02	3.86	0	1.62
0	2.2	3.53	0	0	1.17
0	0	0	1.92	0	0.64
3.80	1535.51				265.86
11.40	4580.23				692.83

Placenta 1	Placenta 2	Placenta 3	média de Pg encontrada nas placentas	Liq A
79,57	41,54	462,55	194,55	234,21
11,11	10,23	331,7	117,69	230,09

		5		
12,38	0	0	4,12	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
3,644	24,09	16,37	14,70	0
0	587,07	0	195,69	0
0	11,56	0	3,85	0
			58,95	51,58
			85,84	102,37

B - Valor das pesagens dos animais prenhes ao longo da gestação, juntamente com a média e desvio padrão de cada animal do modelo experimental por *P. gingivalis*

Animais teste	Peso materno 1	Peso materno 2	Peso materno 3	Peso materno 4	Peso materno 5
312	19	20,04	21,04	29,64	33,01
322	19,55	20,84	22,45	28,13	32,2
362	21,69	21,86	22,4	24,42	25,07
343	23,1	22,29	22,98	25,54	37,67
314	18,3	18,54	19,12	24,6	27,06
324	21,75	21,5	23,5	29,88	33,01
364	18,9	20,1	21,98	28,03	31,92
374	18,24	18,7	19,65	23,6	26,2
3124	16,6	19,56	20,13	23,78	25,56
Média	19,68	20,38	21,47	26,40	30,18
Desvio Padrão	2,078	1,34	1,55	2,52	4,36
Animais controle					
C333	13,29	14,55	20,65	29,3	33,2
C343	13,42	14,65	20,5	25,03	28,31
C363	21,53	19,6	22,24	27,46	37,36
C354	17,76	18,03	19,04	25,18	39,65
C3104	19,64	19,55	20,04	25,76	36,5
Média	17,12	17,27	20,49	26,54	35
Desvio Padrão	3,69	2,52	1,16	1,81	4,39

C - Número de fetos por animal prenhe do modelo experimental por *P. gingivalis*

Animais teste	Número de fetos
312	4
322	8
362	1
343	9
314	8
324	9
364	8
374	5
3124	4
Média	6,22
Desvio Padrão	2,81
Animais controle	
C333	8
C343	9
C363	6
C354	8
C3104	3
Média	6,8
Desvio Padrão	2,38

D – Peso de cada feto coletado por animal prenhe com média por animal e desvio padrão do modelo experimental por *P. gingivalis*

Animais teste	Peso feto 1	Peso feto 2	Peso feto 3	Média do peso dos fetos	Desvio padrão
312	1,08	1,03	1,02	1,04	0,03
322	0,2	0,19	0,2	0,19	0,00057
362	0,6			0,6	
343	0,87	0,87	0,89	0,87	0,011
314	0,26	0,24	0,22	0,24	0,02
324	0,37	0,42	0,35	0,38	0,036
364	0,34	0,34	0,41	0,36	0,04
374	0,31	0,3		0,30	0,007
3124	0,39			0.39	
Animais controle					
C333	0,69	0,66	0,75	0,7	0,045
C343	1,25	1,27	1,21	1,24	0,03
C363	1,27	1,31	1,32	1,3	0,02
C354	0,75	0,62	0,65	0,67	0,068
C3104	0,97			0.97	

E - Média e desvio padrão da dosagem de citocinas (pg/ml) no soro materno dos grupos teste e controle do modelo experimental por *P. gingivalis*.

	Teste	controle
IL-1β	43,78 ± 30,65	42,38 ± 23,97
TNF-α	236 ± 167,8	531,16 ± 473,89
INF-γ	3,38 ± 1,6	5,51 ± 3,54
IL-6	3,63 ± 0,94	3,81 ± 0,99
IL-4	7,03 ± 1,29	7,2 ± 1,78
IL-10	7,53 ± 1,8	6,38 ± 3,78
IL-17α	15,98 ± 11,33	34,2 ± 22,35
GMCSF	10,4 ± 10,4	12,63 ± 10,34
IL-12 P40	130,34 ± 26,34	144,16 ± 8,88
IL-12 P70	16,388 ± 9	38,25 ±

		30,2

F - Média e desvio padrão da dosagem de citocinas (pg/ml) no tecido gengival materno dos grupos teste e controle do modelo experimental por *P. gingivalis.*

	Teste	Controle
IL-1β	23,6 ± 10,7	44,7± 25,8
TNF-α	95,2 ± 42,95	141,7 ± 73,5
INF-γ	4,27 ± 0,7	4,43 ± 1,02
IL-6	3,1 ± 0,69	4,1 ± 2,63
IL-4	5,14 ± 0,43	12,16 ± 15,12
IL-10	3,37 ± 0,49	2,1 ± 0.43
IL-17α	2,53 ± 0,3	5,65 ± 6,85
GMCSF	37,5 ± 10,72	33,2 ± 13,6
IL-12 P40	3,62 ± 0,84	6,5 ± 2,37
IL-12 P70	11,18 ± 2,13	15,3 ± 6,64

G - Média e desvio padrão da dosagem de citocinas (pg/ml) nas placentas dos grupos teste e controle do modelo experimental por *P. gingivalis*

	Teste	Controle
IL-1β	158,74 ± 60,16	110,14 ± 76,47
TNF-α	319,3 ± 232,43	230,11 ± 327,45
INF-γ	4,8 ± 0,75	3,9 ± 1,3
IL-6	5,57 ± 1,25	5,43 ± 2,57
IL-4	8,4 ± 1,49	7,55 ± 1,98
IL-10	11,48 ± 4,1	8,77 ± 5,4
IL-17α	3,55 ± 0,6	3,18 ± 0,7
GMCSF	41,13 ± 8,03	33,82 ± 11,73
IL-12 P40	28,51 ± 16,49	18,78 ± 7,8
IL-12 P70	20,73 ± 12,18	14,1 ± 6,17

H – Medida entre a junção esmalte-cemento e a crista óssea-alveolar entre o primeiro e segundo molar superior direito, dos animais teste e controle e milímetros do modelo experimental por *P. gingivalis.*

Animais	Medida MicroCT (mm)
312	0,4
322	0,312
362	0,4
343	0,324
314	0,34
324	0,33
364	0,313
374	0,309
3124	0,314
C333	0,278
C343	0,259
C363	0,285
C354	0,244
C3104	0,244

I - Valores das médias das cópias do gene 16SrRNA de *A.actinomycetemcomitans* encontrada em cada amostra de cada animal estudado .

Animais	sangue	soro	placenta 1	placenta 2	placenta 3	feto 1	feto 2	feto 3	Liq A
3	22966,01	0	297,53	178,12	1216,95	18504,2	5839,17	0	0
4	1154,33	0	5,68	1,18	0,1	3610,84	59,54	0	0
25	0	0	10233,56	9,27	0	38118,92	1520,91	3874,36	3,66
28	0	4258,84	0	0	ausente	4259,65	6127,81	ausente	0
210	0	0	7061,26	7,18E+11	ausente	0	760,19	0	0
211	0	0	215,01	ausente	ausente	3669,77	ausente	ausente	0

J – Tabela com valores dos pesos dos animais ao longo das pesagens do modelo experimental por *A.actinomycetemcomitans.*

Animais Teste	Dia -4	Dia 1	Dia 6	Dia 11	Dia 16
3	20,44	23,63	24,66	30,2	34,79
4	20,21	23,3	27,69	30,19	31,4
25	19,5	21,12	22,1	26,3	35,13
28	18,8	20,48	21,2	24,5	29,91
210	19,64	21,45	21	24,35	32,01
211	21,44	23,5	23,89	25,95	28,96
Média	20,005	22,24	23,42	26,91	32,03
Desvio Padrão	0,90	1,38	2,55	2,65	2,51
Animais controle					
23c	22,85	25,12	27,75	31,74	38,6
29c	18,8	19,96	21,83	23,54	27,55
36c	16,4	17,1	21,66	26,2	33,21
37c	17,7	19,18	19,88	24,45	29,77
38c	18,47	18,53	18,91	22,3	28
Média	18,84	19,97	22,006	25,64	31,42
Desvio Padrão	2,42	3,06	3,43	3,69	4,58

K – Número de fetos obtidos por cada animal prenhe do modelo experimental por A.actinomycetemcomitans.

Animais teste	Número de fetos
3	6
4	6
21(PP)	4
25	7
28	4
210	5
211	3
Média	5
Desvio Padrão	1.,41
Animais Controle	
23c	6
29c	2
36c	7
37c	5
38c	5
Média	5
Desvio Padrão	1,87

L – Peso de cada feto obtido por cada animal de ambos os grupos, teste e controle do modelo experimental por *A.actinomycetemcomitans.*

Animais teste	Peso feto 1	Peso feto 2	Peso feto 3	Média	Desvio Padrão
3	1,05	0,98	1,4	1,143	0,22
4	0,8	0,78	0,7	0,76	0,05
25	1,03	1,15	1,1	1,09	0.,06
28	1,05	1,11	1,25	1,13	0,1
210	0,59	0,54	0,54	0,55	0,02
211	1,2	1,2	1,33	1,24	0,07
Animais Controle					
23c	1,4	1,62	1,54	1,52	0,11
29c	0,87	0,81		0,84	0,04
36c	1,04	1,18	1,09	1,1	0,07
37c	1,21	1,23	1,22	1,22	0,01
38c	1,18	1,2	1,7	1,36	0,29

M - Média e desvio padrão da dosagem de mediadores inflamatórios (pg/ml) no soro materno dos grupos teste e controle do modelo experimental por *A.actinomycetemcomitans.*

	Teste	Controle
TNF-α	49566,78 ± 6211,98	45892,43 ± 9129,52
IL-4	197,27 ± 172,41	226,55 ± 281,02
IL-6	87,7 ± 43,23	150,46 ± 220,97
INF-Y	605,3 ± 613,49	1086,11 ± 1590,25
IL-17	1135,99 ± 188,76	1862,39 ± 10002,84

N - Média e desvio padrão da dosagem de mediadores inflamatórios (pg/ml) nas placentas dos grupos teste e controle do modelo experimental por *A.actinomycetemcomitans.*

	Teste	Controle
TNF-α	80721,05 ± 1408,5	3983,7 ± 698,39
IL-4	88,98 ± 93,34	45,19 ± 57,95
IL-6	167,63 ± 82,92	97,64 ± 102,55
INF-Y	600,04 ± 360,59	1073,38 ± 727,61
IL-17	668,78 ± 119,38	1242,45 ± 430,31

O - Zi MY, Longo PL, Bueno-Silva B, Mayer MP. Mechanisms Involved in the Association between Periodontitis and Complications in Pregnancy. Front Public Health. 2015; 29;2:290

frontiers in
PUBLIC HEALTH

REVIEW ARTICLE
published: 29 January 2015
doi: 10.3389/fpubh.2014.00290

Mechanisms involved in the association between periodontitis and complications in pregnancy

Marcela Yang Hui Zi, Priscila Larcher Longo, Bruno Bueno-Silva and Marcia Pinto Alves Mayer*

Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Edited by:
Alexandrina L. Dumitrescu, Dental Private Practice, Romania

Reviewed by:
Pralhad Kushtagi, Manipal University, India
Olivier Huck, Université de Strasbourg, France

****Correspondence:***
Marcia Pinto Alves Mayer, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 Lab. 110, São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil
e-mail: mpamayer@icb.usp.br

The association between periodontitis and some of the problems with pregnancy such as premature delivery, low weight at birth, and preeclampsia (PE) has been suggested. Nevertheless, epidemiological data have shown contradictory data, mainly due to differences in clinical parameters of periodontitis assessment. Furthermore, differences in microbial composition and immune response between aggressive and chronic periodontitis are not addressed by these epidemiological studies. We aimed to review the current data on the association between some of these problems with pregnancy and periodontitis, and the mechanisms underlying this association. Shifts in the microbial composition of the subgingival biofilm may occur during pregnancy, leading to a potentially more hazardous microbial community. Pregnancy is characterized by physiological immune tolerance. However, the infection leads to a shift in maternal immune response to a pathogenic pro-inflammatory response, with production of inflammatory cytokines and toxic products. In women with periodontitis, the infected periodontal tissues may act as reservoirs of bacteria and their products that can disseminate to the fetus-placenta unit. In severe periodontitis patients, the infection agents and their products are able to activate inflammatory signaling pathways locally and in extra-oral sites, including the placenta-fetal unit, which may not only induce preterm labor but also lead to PE and restrict intrauterine growth. Despite these evidences, the effectiveness of periodontal treatment in preventing gestational complications was still not established since it may be influenced by several factors such as severity of disease, composition of microbial community, treatment strategy, and period of treatment throughout pregnancy. This lack of scientific evidence does not exclude the need to control infection and inflammation in periodontitis patients during pregnancy, and treatment protocols should be validated.

Keywords: periodontal diseases, pregnancy, preterm birth, inflammation

INTRODUCTION

Every year, about 15 million babies around the world are born preterm (PT) (after 23 weeks and before 37 weeks of gestation). Over 60% of PT births occur in Africa and South Asia, but PT birth is truly a global problem. Across 184 countries, the rate of PT birth ranges from 5 to 18% of the babies born and the highest rates per live births are presented in Malawi, Comoros, Congo, Zimbabwe, Equatorial Guinea, Gabon, Pakistan, Indonesia, and Mauritania (1). In Latin America, PT births comprise 7% of live births in Chile, 9% in Brazil, and reach 14% in Costa Rica, whereas in North America, it ranges from 8% in Canada to 12% in the USA. It is 7% in China. In Europe, it can be as low as 6% in Scandinavian countries, 7–9% in France, UK, Italy, and Germany, reaching 15% in Cyprus (2). Spontaneous PT labor leads to 70% of PT births, whereas the remainder is medically indicated because of maternal or fetal complications, such as preeclampsia (PE) or intrauterine growth restriction (3).

Babies born PT and/or those with intrauterine restricted growth conditions (IUGR) are usually born with low weight (LBW), which is considered as those born with <2,500 g (4). Although most studies use this reference value, it is deficient for PT birth. More recently, other generic references based on birth weight percentiles adapted to local populations were recently validated (5), but studies on the influence of different parameters using these new references are still lacking. A survey in 138 low-income and middle-income countries revealed that 22% of the children born in 2010 were both term and small-for-gestational-age, 8.1% were PT and appropriate-for-gestational-age, and 2.1% were PT and small-for-gestational-age (6).

Preterm birth is the leading cause of newborn deaths (in the first 4 weeks of life) (1). Low birth weight babies also present a higher risk of adverse outcomes in the perinatal period, including increased mortality rate (7). The mortality risk in the first month of life is 10–40 times higher for PT-small for the gestational age than for term and appropriate-for-gestational-age infants (8). Furthermore, babies born PT are at higher risk of developing neurological, respiratory, and gastrointestinal diseases, attributed to immaturity of multiple organ systems (3, 9). Many survivors face a lifetime of disability, including learning disabilities and visual and hearing problems (1).

Risk factors for small-for-gestational-age babies might differ from those to reduce the number of babies born PT. In South Asia, the prevalence of babies born at term but small for the gestation age is higher than in Latin America. The very high rates

of small for the gestational age babies might be explained by higher rates of adolescent pregnancy, chronic maternal malnutrition, low pre-pregnancy body-mass index, low weight gain in pregnancy, and low maternal height (8). The prevalence of LBW and PT is usually higher in low-income populations, however, other factors besides the socioeconomically status and access to prenatal health care (10), also influence these rates. Other common causes of PT birth include genetic and ethnic factors, multiple pregnancies, age, behavioral, and environmental factors including tobacco usage, chronic conditions (such as diabetes and high blood pressure), and infections (1, 11).

One of the most common and dangerous complications of pregnancy is PE. It is a multisystem disorder associated with elevated blood pressure and proteinuria, typically after 20 weeks of gestation. PE is primarily a generalized dysfunction of the maternal endothelium, which appears to be part of an exaggerated systemic inflammatory *response* that involves maternal leukocytes and pro-inflammatory cytokines. Briefly, PE is the result of inadequate development of maternal spiral arteries due to insufficient trophoblast invasion, leading to narrower blood vessels, which limit the blood supply from the mother into placental blood spaces. Acute arthrosis of spiral arteries aggravates the problem, resulting in hypoxia of the placenta. In a second stage, the ischemic placenta sheds subcellular trophoblast microparticles *to the maternal circulation*, which induces maternal leukocytes and endothelial cells to produce pro-inflammatory cytokines. Worldwide, PE affects an estimated 2–10% of pregnant women and is the chief cause of induced PT delivery, and slow growth of infants (12).

Even at very early gestation, fetal cells leak and are found in maternal circulation. The embryo/fetus expresses paternal antigens, which have to be tolerated throughout the gestation period by the mother (13). Thus, the maternal immune regulatory system must be activated in order to suppress maternal immunity toward fetal antigens, to allow implantation and fetus development during gestation, but still being able to elicit normal immune responses against infections (13, 14).

Regular pregnancy is predominantly characterized by a Th2 type immune response, which determines the protective maternal response to fetal development (15–18). Hormones, such as progesterone and prostaglandin E, play a key role in this Th1–Th2 shift during pregnancy (14, 19). More recently, the Th1/Th2 paradigm has been expanded with the addition of Th17 and regulatory T-cell (Tregs). The Th-17 inflammatory response is also dampened during pregnancy (20) and Tregs play a key role in maternal tolerance. Tregs recruitment and expansion are induced even before conception by the seminal fluid (21) and then by the embryonic trophoblasts, and these cells display immunosuppressive features, promote invasiveness, result in preferential production of Th2 cytokines and reduce the cytotoxicity of decidual natural killer (NK) cells (22).

Inflammation breaks the homeostasis at the maternal–fetal interface, revoking these immune privileges during gestation (9) and induces a Th1 pattern of cytokines, with significant fetal losses (23). Certain infectious diseases, even sub-clinical infections, may result in enhanced IL-12 production and in turn an overall shift toward type 1 bias. Th-1 response leads to the activation of decidual macrophages, which secrete toxic levels of nitric oxide and TNF-α. This leads to maternal rejection of the implanted embryo, which is termed as cytokine-triggered vascular autoamputation and involves the activation of coagulation mechanisms, resulting in vasculitis affecting the maternal blood supply to the implanted embryo (19). Furthermore, extracellular bacterial or fungal pathogens elicit a Th17 response, and an imbalance in the proportion of Th17/Treg is associated with recurrent pregnancy loss and other gestation adverse effects (13).

Infections during pregnancy, caused by bacteria, viruses, and parasites, can lead not only to PT birth but also to fetal death, injury, or other organ sequel depending on the pathogen. Some pathogens are known as classic teratogens, designated as TORCH (*Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, rubella, cytomegalovirus, and herpes simplex virus), but others may be included in this list, such as parvovirus B19, varicella zoster virus, and *Plasmodium falciparum* (24).

About 50% of the PT births were not associated with any known factor (11), leading to the search of alternative factors. Maternal infections of the genitourinary tract may promote the migration of cervical vaginal bacteria to the uterus (25). Bacteria colonizing the vagina, such as *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, group B *Streptococcus*, and *Mycoplasma hominis* may ascend from the lower genital tract and were recovered in the amniotic fluid (24) and placenta (9). Infections in other parts of the body may also play an important role in the induction of births and prematurity by stimulating an immune response and due to the transit of microorganisms and/or their toxins in the bloodstream to the maternal–fetal unit (26).

Thus, differing from the common thinking not too long ago, the fetal-placenta unit may not be sterile, and nearly one-third of placental specimens harbor intracellular bacteria in the basal plate (the tissue layer at and below the maternal–fetal interface). Furthermore, the prevalence of placenta samples with detectable bacteria is higher in PT deliveries, although most of these infections are asymptomatic (27). Also contradicting previous paradigms, a recent placenta microbiome study reported a very close similarity between placental and oral microbiomes, and not with the urogenital tract microbiome, as expected (28). This latter study has also revealed a correlation between the placental microbiome with PT birth.

In this context, the infected periodontal tissues may be associated with prematurity by acting as reservoirs of bacteria and their products, which can disseminate to the fetus-placenta unit. Furthermore, immunological mediators at high concentrations produced locally at the infected gingival tissues or systemically can reach the fetus-placenta unit, resulting in prematurity and low weight at birth (11, 29). Although some aspects of the association between periodontitis and complications in pregnancy were elucidated, this relationship needs to be better studied and characterized. Therefore, we aimed to review the existing literature associating periodontal disease, its microbiota and immune response with the complications in pregnancy.

PREGNANCY AND PERIODONTAL DISEASES

Periodontitis is an inflammatory disease of the soft and hard support tissues of tooth in response to the supra and subgingival

microorganisms. It is classically divided into chronic and aggressive periodontitis (30). Chronic periodontitis is characterized by a slow and continuous destruction of periodontal tissues (31, 32), while the destruction of the periodontal ligament and alveolar bone is more rapid and severe in aggressive periodontitis (33). Furthermore, periodontitis can affect most teeth (generalized), or can be restricted to a group of teeth, and described as localized.

Despite the enormous microbial diversity in the oral cavity, up to now, few species were associated with periodontitis (34), based mainly on their higher prevalence in diseased subjects, and their elimination after a successful treatment. The Gram negative anaerobes of the Socransky's red complex, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* (35) have been associated with chronic periodontitis (36). *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, and the facultative Gram negative rod *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, particularly serotype b, and to a lesser extent serotype c, were found in higher levels in patients with aggressive generalized or localized periodontitis when compared to controls (37, 38). However, patients with localized disease did not present high IgG titers to *T. forsythia* as observed for patients with generalized periodontitis, although both were colonized by the organism, suggesting differences in immune response associated with the extension of disease (39).

Recent data suggested an additional list of suspected pathogens formed by 17 species or phylotypes, mostly detected by high throughput sequencing techniques, but more studies on their *in vivo* ecological roles are needed before they can be recognized as periodontopathogens (40). Despite the dramatic differences in the microbial composition in healthy periodontium and periodontitis, periodontal pathogens may not directly cause periodontitis but rather they redesign the typically symbiotic microbiota into a dysbiotic one, which disrupts the normal homeostatic relationship with the host tissues (41). Thus, not only would certain pathogens be involved in the disease but rather a dysbiotic community may challenge the host, and the inflammatory destructive process is the result of these multiple interactions.

The response to a microbial challenge is not homogeneous in man, and several polymorphisms have been reported in genes associated with the production of cytokines. Some of these polymorphisms have been associated with increased susceptibility to periodontitis in certain populations (42).

The subgingival microbiota and host susceptibility differ between aggressive and chronic periodontitis, leading to differences in cytokines and adhesion molecules (43). The local cytokines production in gingival tissues differs between types of periodontitis, although no differences in inflammatory mediators in serum were demonstrated (44). Gingival tissues from patients with aggressive periodontitis present higher levels of protein-1-α (MIP-1α), IFN-γ-induced protein 10 (IP-10) and its receptors CCR5 and CXCR3, and lower levels of IL-10 than tissues of chronic periodontitis patients. On the other hand, tissues of chronic periodontitis show increased expression of monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and its receptor CCR4 (45).

Likewise, the levels of the adhesion molecule CD11a of T cells also differ in tissues from aggressive and chronic periodontitis, evidencing distinct cellular sources of immune regulatory cytokines (46). The levels of the pro-inflammatory cytokine IL-17 in gingival crevicular fluid (GCF) of aggressive periodontitis are higher than in GCF of chronic periodontitis patients, whereas the levels of IL-11, an anti-inflammatory mediator, were decreased in aggressive compared to chronic periodontitis (47). Interestingly, IL-17 induces the production of prostaglandin E2 (PGE2), and is associated with increased bone loss (48), whereas IL-11 induced osteoblastic differentiation and bone formation (49).

Not only may periodontitis interfere with pregnancy but also pregnancy may alter the progression of periodontal diseases (PD). Physiological changes induced during pregnancy may alter the inflammatory response, amplifying the gingival inflammation. Pregnancy gingivitis affects 36–100% of pregnant women (50). Clinical parameters such bleeding on probing and pocket depth (PD) may increase during pregnancy, without concomitant increase in plaque index, which decreases after delivery (51). The mechanisms underlying the increased severity of PD during pregnancy were associated to increased vascular permeability, depression of the immune system, and shifts on the composition of supra and subgingival microbiota (50).

Early studies have demonstrated that *Prevotella intermedia* and, to a lesser extent, *P. gingivalis* can use progesterone and estradiol in replacement of vitamin K, a required growth factor for these species (52). More recently, an increase in salivary progesterone concentration from the first to the second trimester of pregnancy has been linked to increased levels of *P. gingivalis* (50).

Culture and target molecular techniques for bacterial identification have been used to evaluate the effect of gestation on the oral microbiota. The increase in clinical parameters of periodontal disease severity, such as increased bleeding on probing during gestation, is associated with increased levels of anaerobic species associated with mature dental biofilm including species of *Fusobacterium* and *Prevotella*, *Streptococcus anginosus*, and *Streptococcus intermedius* (53). Other data reported that the proportions of certain putative periodontopathogens such as *A. actinomycetemcomitans* and *Parvimonas micra* were increased during pregnancy (50). In a case–control study, levels of eight oral bacteria species (including the red complex and *A. actinomycetemcomitans*) tended to increase from 22nd week of pregnancy in mothers of premature babies, while these levels remained stable in mothers at term delivery. The prevalence of *A. actinomycetemcomitans* was very low in the PT group during early pregnancy, but increased during pregnancy, reaching levels 2.42-folds higher in the PT group after delivery than in the term group (54).

The microbial diversity of the oral cavity has still not been evaluated in a longitudinal study throughout the gestational period. However, metagenomic studies on the gut microbiota of pregnant women may provide some clues on the microbial shifts occurring in mucosa surfaces over the course of gestation. Metagenomic analyses of stools of pregnant women in different gestational phases and controls demonstrated an increase in abundance of Proteobacteria and Actinobacteria from the first to the third semester, and a decrease in microbial richness, which persisted 1 month postpartum. Moreover, the microbial shift was followed by increased levels of IFN-γ, IL-2, IL-6, and TNF-α in stools, indicating that despite the anti-inflammatory conditions at the placental interface, gestation leads to low-grade inflammation of the intestinal mucosa. It is important to notice that the microbial

composition determined the inflammatory status of the mucosal surface, and not the opposite, since the experimental transfer of the fecal microbiota obtained from women at the third semester of gestation (fecal transplantation) was able to induce inflammation in recipient mice (55). These data evidenced that changes in immunity and/or hormone levels during gestation induce changes in the composition of the microbiota, which leads to increased inflammatory response in mucosal surfaces.

Altogether, these data provide evidences that physiological changes associated with pregnancy lead to shifts in the microbial communities colonizing mucosa surfaces, which then induce pro-inflammatory immune responses. Thus, the already dysbiotic microbiota in subgingival sites of PD patients would be submitted to additional factors promoting imbalance during pregnancy, increasing its pathogenic potential to induce gingival inflammation.

Epidemiological data suggested that PD represent a potential risk for PT birth, as shown in **Table 1**. Cross-sectional studies have shown the association between PD and prematurity and/or low birth weight (56, 57). Case–control studies indicated that periodontitis can increase the risk for prematurity by seven times (58). On the other hand, two case–control studies carried out in Brazil (59, 60) showed no relationship between periodontitis and PT low birth weight.

This review did not aim to cover all epidemiological studies on the topic but rather to discuss the reasons of conflicting results. This is covered by several systematic reviews with meta-analyses, which revealed a significant risk of PT delivery and low birth weight with periodontitis (69–71). The odds ratio for PT birth in mothers with periodontitis varied from 1.7 to 2.73; for low birth weight from 1.5 to 2.11; and for PT birth and low weight, from 2.35 to 3.57. Therefore, all meta-analysis demonstrated that PD could promote adverse pregnancy outcomes. In addition, meta-analyses (72, 73) have also identified a significant association between PE and PD.

As shown in **Table 1**, the results of some cohort, case–control, prospective, and cross-sectional studies were conflicting due to factors as number and demographic characteristics of the participants, parameters for periodontal disease diagnosis, inclusion of pregnant women in different gestation periods, and different statistical analysis.

Most studies on the association between periodontitis and gestational complications considered the subjects either as diseased or healthy. However, the incidence of PT delivery increases with increased severity of periodontitis (74, 75). Furthermore, few studies correlated the outcome in gestation with microbial parameters (**Table 1**). Due to variations in the microbial composition and immune response among periodontitis patients, it seems clear that the severity, extension, and type of periodontitis should be considered when the systemic effects of periodontitis are evaluated in a population. Environmental and genetic factors involved in altered immune response (42) against bacterial infections may also influence the effect of periodontitis in pregnancy.

These confounder factors prevented a definitive conclusion whether periodontitis is an independent risk factor of PT birth and/or low birth weight or PE, and larger randomized controlled trials to explore causality and to dissect the biological mechanisms involved in the association of periodontitis and gestation outcomes are still needed.

DISSEMINATION OF ORAL BACTERIA AND THEIR PRODUCTS TO EXTRA-ORAL SITES

The effect of periodontal pathogens in distant sites is related not only with prematurity and low birth weight babies but also with other systemic diseases such as arthritis, cardiovascular disease, atherosclerosis, liver disease, diabetes, stroke (16), and Alzheimer's disease (76). Oral bacteria are frequently found infecting extra-oral sites. *S. intermedius* was reported causing a brain abscess (77). *A. actinomycetemcomitans* is the most prevalent species in bacterial endocarditis among members of the HACEK group (*Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, and *Kingella*), which includes the facultative anaerobic Gram negative bacilli that inhabit the oropharynx associated with endocarditis (78). *P. gingivalis* (79) and *A. actinomycetemcomitans* (80) specific DNA could be detected in atherosclerotic plaques in the aorta.

Several species present in the gastrointestinal tract and oral cavity were detected in neonatal gastric aspirates (81). The oral origin of most periodontal pathogens such as *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, and *T. forsythia* found in extra-oral sites is highly possible since they inhabit the oral and no other mucosal surfaces such as the vagina and intestine. On the other hand, *Fusobacterium nucleatum* is associated not only with oral but also with vaginal mucosa membranes (82, 83). However, the oral origin of *F. nucleatum* in the placenta-fetal unit has been considered since this species was detected in samples obtained from neonatal gastric aspirates, only of mothers with periodontal pockets (83) and the same strain was not present in the vaginal samples (84).

Analyses of amniotic fluid or placenta samples have demonstrated the presence of several oral bacteria, mainly *P. gingivalis* and *F. nucleatum* (85–88). *P. gingivalis* was detected in the amniotic fluid from mothers with premature labor and periodontitis. Subsequently, this periodontal pathogen was detected in placenta, in chorionic trophoblasts, and in several types of cells such as amniotic epithelial, decidual, and vascular (87).

Fusobacterium nucleatum is the most frequently detected species in the amniotic fluid of premature births with intact membranes (89, 90). In addition, *F. nucleatum* was linked to early-onset neonatal sepsis once it was detected in cord blood and amniotic samples from PT births (91–93).

Periodontal pathogens, especially *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*, were detected in the amniotic fluid of pregnant women with periodontitis (94). These periodontal pathogens were also related to placenta infections in hypertensive women (95).

Patients with PE showed higher levels of *T. forsythia*, *F. nucleatum*, and *A. actinomycetemcomitans* in placenta. In addition, 50% of placenta samples from women with PE were positive for one or more periodontal pathogens while only 14.3% of the control group samples had detectable levels of periodontopathogens. Moreover, infection levels were significantly higher in the PE group (86).

Recently, the placental microbiome was characterized in a population-based cohort study with placenta samples from 320 subjects (28). Interestingly, a very close similarity between placental and oral microbiomes was demonstrated, and not with

Table 1 | Epidemiological data on the association of periodontal diseases and preterm birth and/or low birth weight and other alterations of the gestational pattern.

Study type	Participants number	Parameters	Results	Reference
Case–control	Controls $n = 124$ Cases $n = 93$	LBW, MPD, PTB, preterm labor, premature rupture of membranes	LBW significantly high in mothers with more severe PD, indicating that MPD is a significant risk factor for LBW	Offenbacher et al. (61)
Case–control	Controls $n = 611$ Cases $n = 304$	IUGR, LBW, MPD, PTB	Results do not support the hypothesis of association of MPD and IUGR, LBW, and PTB	Bassani et al. (59)
Case–control	Control: $n = 1042$ IUGR $n = 77$ LBW $n = 235$ PTB $n = 238$	IUGR, LBW, MPD, PTB	MPD is associated with an increased risk for PTB, LBW, and IUGR	Siqueira et al. (57)
Case–control	Controls $n = 393$ LBW $n = 96$ PTB $n = 110$ PTB + LBW $n = 63$	LBW, MPD LBW, PTB + LBW	MPD was more severe in control individuals than in cases. The extent of periodontal disease did not increase risk of LBW. Mean PPD and frequency of periodontal sites with clinical attachment level ≥ 3 mm in PTB + LBW cases were lower than in control	Vettore et al. (60)
Case–control	Controls $n = 20$ PE $n = 20$	MPD, PE	PE was associated with MPD. PE cases were 4.33 times more likely to have MPD (OR = 4.33)	Varshney and Gautam (62)
Case–control	Controls $n = 44$ LBW $n = 44$	Bleeding on probing, presence of supragingival calculus and CPITN (community periodontal index for treatment needs), LBW, MPD	MPD was associated with LBW. Mothers of LBW infants had less healthy areas of gingiva and more deep pockets	Haerian-Ardakani et al. (63)
Cohort	$n = 1,115$	PE, PD	Women were at higher risk for preeclampsia if they had severe periodontal disease at delivery (OR = 2.4), or if they had periodontal disease progression during pregnancy (OR = 2.1)	Boggess et al. (64)
Cross-sectional	$n = 449$	LBW, MPD, PTB, LBW + PTB	There was no statistically significant association between MPD and LBW	Lunardelli and Peres (56)
Cross-sectional	$n = 277$	LBW, MPD, PE, PTB	MPD were at higher risk for developing PE, PTB, and LBW. The rate of PE in women with PD was 18.6% compared to 7.3% in the control group (OR = 2.7). The OR for PTB was (4.4) and for LBW was (3.5) when mother had PD	Alchalabi et al. (65)
Cross-sectional	$n = 770$	LWB, MPD, PPD, PTB, reduced maternal haemomglobin levels	Mothers with PPD >6 mm (OR = 2.21) had a higher risk of LBW. The increase in the severity of MPD was associated with increased in PTB and the MPD severity influenced the maternal hemoglobin levels, i.e., more severe periodontitis was associated with lower hemoglobin levels	Kothiwale et al. (66)
Cross-sectional	$n = 390$	Periodontopathogens, MPD	Prevalence of gingivitis was 38% and clinical periodontitis was 10%. Among the periodontitis group, high detection rates of *P. gingivalis* (56%), *Prevotella nigrescens* (44%), *T. denticola* (32%), and *P. intermedia* (24%) were associated with PD	Tellapragada et al. (67)

(Continued)

Table 1 | Continued

Study type	Participants number	Parameters	Results	Reference
Prospective study	$n = 1017$	PD, LBW	Moderate or severe periodontal disease was associated with a LBW, a risk ratio of 2.3 (1.1–4.7), adjusted for age, smoking, drugs, marital and insurance status, and preeclampsia. Moderate or severe periodontal disease early in pregnancy is also associated with LBW	Boggess et al. (64)
Prospective study	$n = 283$	PD, PE	There was a significant relationship between periodontitis and the occurrence of preeclampsia among never-smokers (OR = 5.56)	Ha et al. (68)

IUGR, intrauterine growth restriction; LBW, low birth weight (<2,500 g); MPD, maternal periodontal disease; PD, periodontal disease; PE, preeclampsia; PPD, probing pocket depth; PTB, preterm birth (gestacional age <37 weeks).

other niches such as the genitourinary tract or the gut. However, only one patient diagnosed with periodontitis was enrolled in that study, thus no association between the microbial composition of placenta and periodontitis could be made.

Present data support the hypothesis that oral bacteria can reach the maternal–fetal unit and may lead to gestational alterations. However, whether the colonization of commensal or putative periodontopathogens would result in different outcomes in pregnancy remains to be elucidated. Further studies, using new generation sequencing techniques, must be performed to evaluate the diversity of the microbiota at the placenta-fetal unit and mucosal surfaces, including the oral cavity, in order to establish the association of specific microbial communities with gestation alterations.

MECHANISMS INVOLVED IN THE ASSOCIATION BETWEEN INFECTIONS AND PRETERM BIRTH AND OTHER GESTATIONAL COMPLICATIONS

The inflammatory cascade triggered by bacterial infections is supposed to play a central role in the pathogenesis associated with premature birth and fetal injury. Bacterial products stimulate the production of cytokines by placental tissues, as chorion, decidua, and trophoblasts (96). During infection, the cytokines produced by the fetal membranes in response to bacterial pathogens have a dual role: to control the growth of bacterial agents and, at the same time, to exacerbate the inflammatory process, which may lead to fetal injury and premature labor (9).

Generally, there is a relationship between the level of periodontal pathogens colonizing the subgingival sites and the antibody response to these pathogens (38, 39). However, the data on the relationship between maternal antibody response to periodontal pathogens and low weight at birth are contradictory.

Levels of maternal IgG against oral organisms were inversely related to premature and low weight births, suggesting that the antibodies would offer protection to the mother and fetus (97). In contrast, women in the second trimester of pregnancy with high serum IgG levels to *P. gingivalis* were more prone to have low weight babies than those with normal values (98). On the other hand, pregnant women with periodontitis and low titers of anti-*P. gingivalis* antibodies were seven times more at risk of PT delivery than those with high titers, suggesting that the suppression of maternal IgG response to *P. gingivalis* would be a risk factor associated with PT delivery (54). Furthermore, the levels of antibodies to *P. gingivalis* were 30% higher in placenta tissue of PT births due to chorioamnionitis, than in those at term delivery (87). Overall, the data suggest that high antibodies titers to *P. gingivalis* are usually indicative of periodontal pockets with high levels of this organism, leading to increased risk for PT birth. However, in heavily colonized women (severe periodontitis), when the antibodies response to periodontopathogens is low, the risk of gestation alterations would be higher than in women with high antibodies titers.

Pathogens and their products are recognized by receptors of the innate immune system, and the binding of these evolutionarily conserved recognition molecular patterns (PAMPS) to their receptors activates several signaling pathways, leading to an inflammatory response aiming to eliminate the bacterial agent. Each receptor located on the cell surface of various cells of the human body is specific for the recognition of a PAMP. For instance, the lipopolysaccharide (LPS), located at the outer membrane of Gram negative bacteria, is recognized by a toll-like receptor (TLR), mainly TLR4.

As described in the previous sections, the microbial community in subgingival sites of periodontitis patients is formed by a high percentage of Gram negative bacteria, of which the LPS is continuously challenging the host cells. Thus, several studies that reported the effect of LPS on pregnancy could help explaining the role of the microbial community on gestational complications. However, it is worth mentioning that LPS from different bacteria may exhibit different properties. For instance, *P. gingivalis* presents a complex atypical LPS that is not only recognized by TLR4 but also by TLR2, resulting in different signaling than that promoted by TLR4 binding (99). On the other hand, *P. gingivalis* represents a very low proportion of the subgingival microbiota, despite its association with periodontitis, and both TLR4 and TLR2 are highly expressed in inflamed gingival tissues (100). Thus, the effects of *E. coli* LPS, a TLR4 binding LPS, as described next, may not be interpreted as the effects of the whole LPS of subgingival sites.

Interestingly, the expression of TLR4 in placenta is higher in women with premature delivery and chorioamnionitis than in controls (101). LPS induces the production of pro-inflammatory mediators such as prostaglandins, which are modulators of uterine contractions. In addition, LPS stimulation of uterine tissues in mice with NK cell deficiency showed a reduction in the production of Th1 cytokines. This indicates that the NK cells of the uterus, which produce cytokines in the early stages of pregnancy, can be cytotoxic in the presence of pathogens, by producing pro-inflammatory cytokines such as TNF-α and IL1-β, and leading to deleterious effects to the fetus such as low placental and fetal weight (102). It is important to notice that the LPS dose tested in experimental mice in the latter study was 250 times lower than used for the endotoxemic shock, thus it would possibly simulate the LPS produced during a non-lethal infection by a Gram negative bacteria.

An *in vivo* model of PE demonstrated that infusions with LPS in the first and 14th day of gestation induced increased blood pressure and proteinuria (103). Furthermore, the LPS-induced PE led to disseminated intravascular coagulation (104).

Systemically, periodontitis results in higher levels of several inflammatory mediators, such as IL-6 and TNF-α, in response to the challenge promoted by the oral biofilm (105). Experimental intravenous injection of IL-6 in pregnant rats revealed that this cytokine can directly induce maternal fetal injury and stimulate the release of fetal hormones that cause stress (106).

TNF-α is a well-recognized mediator of activation of endothelial injury, a key mechanism of pathogenicity of PE. Blood cells of patients with severe PE produce higher levels of TNF-α without any stimulus. Nevertheless, LPS stimulus reduced the release of TNF-α by these cells indicating that the spontaneous release of TNF-α by leukocytes from patients with PE is the result of the disease process (107).

However, high concentrations of LPS can modulate myometrium contraction, and then induce PT delivery, possibly due to increased levels of IL-6, TNF-α, and PGF2. After treatment with LPS, additional TNF-α promotes even more contraction of myometrium cells (108).

Furthermore, an experimental animal model showed that fetal exposure to LPS can alter the development and permeability of intestinal epithelium (109), resulting in increased necrotic lesion (110). The fetal ingestion of amniotic fluid with microorganisms and microbial products such as LPS can cause enteritis, accelerate the motility of the colon, and results in the production of meconium during intrauterine life (111). Fetal exposure to intrauterine infection was also associated with fetal inflammatory response syndrome, leading to intrauterine growth restriction (112).

Studies in experimental animal models evaluated the effects of few bacteria species or their products in gestation, and definitively should not be extrapolated to the effects induced by the whole oral microbiota. However, they evidenced that the characteristics of the prenatal infecting pathogen may determine the outcome of infection in the development of pregnancy. For instance, the challenge of human fetal membranes with *G. vaginalis* and *Candida albicans*, but not with *Streptococcus agalactiae*, results in production of IL-10, which acts essentially in maintaining pregnancy by limiting the damaging effects of pro-inflammatory cytokines (113).

The intravenous inoculation of different *P. gingivalis* strains in rats on the 14th day of gestation, led to the placenta colonization at the 18th day. Interestingly, placenta colonization was dependent on the *P. gingivalis* strain, with a higher virulence potential of the fimbriated ones (114). Lately, infusion of *P. gingivalis* LPS on the 14th day of gestation in pregnant rats resulted in increased maternal systolic pressure, reduced placental weight, decreased fetal weight, and induced fetal resorption without causing generalized inflammatory response (115).

The intravenous inoculation of *F. nucleatum* into pregnant rats resulted in infection of placental membrane and invasion of the amniotic cavity, causing premature births, stillborn fetus, and shorter survival (116). Pregnant rats infected with *F. nucleatum* showed increased expression of IL-8 in a TLR-dependent manner. Furthermore, TLR4A (TLR4 agonist), but not TLR2A, reduced fetal death. Interestingly, TLR4 deficiency led to a reduction in the inflammatory response without affecting bacterial colonization in placenta, suggesting a possible use of TLR4 agonists as co-adjuvant of antibiotic therapy in the treatment of women with Gram negative bacterial infections during pregnancy (90).

On the other hand, intravenous inoculation of dental plaque containing *P. gingivalis* and *F. nucleatum* resulted in the presence of *F. nucleatum*, but not of *P. gingivalis* in placenta (88). This data should be taken with caution since the levels of both species possibly differed in the inoculums, and *P. gingivalis* exhibits strain with different virulent potential.

The subcutaneous inoculation of viable or heat-killed (HK) *P. gingivalis* in hamsters on the 8th day of gestation resulted in increased production of PGE2 and TNF-α. In animals inoculated with HK bacteria, the fetal weight was reduced in 24% and fetal resorption was 10.6% more frequent than in the control (117). Moreover, an experimental model in pregnant mice where viable *P. gingivalis* cells were inoculated into subcutaneous cameras resulted in the presence of the bacteria in the uterus and liver of infected animals, and fetus were small for the gestational age (118).

Our research group showed that rats infected subcutaneously with *P. gingivalis* at different stages of gestation showed elevated levels of IL-6 and TNF-α in serum and placenta, lower maternal weight gain, and low fetal weight when compared to non-infected controls. The infectious process was more intense and widespread in rats infected before or in the middle of the pregnancy when compared to groups infected at the beginning of pregnancy. Fetus-placental resorptions were observed mainly in mid-term pregnant infected rats, indicating that infection with *P. gingivalis* interferes more severely in fetus when the infection occurs at this phase of pregnancy (119).

Periodontitis induced by ligature in baboons provided evidence of a correlation between anti-*P. gingivalis* antibodies and pregnancy alterations (120). Periodontitis induced at the end of pregnancy resulted in increased production of IL-6, while the levels of PGE2 and IPB (induction factor of bactericidal permeability) increased only in groups that received ligature before pregnancy or in the 3rd month of pregnancy (121).

Despite the value of these results, these trials do not characterize chronic disease observed in humans. In general, these studies suggest that increased synthesis of inflammatory cytokines

and metaloproteinases promoted by periodontopathogens could induce premature labor. Moreover, the translation of data obtained in animal models to humans may also be jeopardized by differences in placenta and uterus structure, hormones regulation, immune system, length of gestation between other mammals and humans (122). However, they are valuable evidences of the role of bacteria and their products in affecting the homeostasis of the maternal–fetal unit and leading to abnormal pregnancy.

The current understanding of PT labor is that the switch of the myometrium from a quiescent to a contractile state is accompanied by a shift in signaling from anti-inflammatory to pro-inflammatory pathways (3). Microorganisms and their products, including those in subgingival sites, can reach the amniotic fluid via hematogenous dissemination. They are then recognized by microbial pattern recognition receptors such as TLRs, signaling the pro-inflammatory pathways in placenta and also in fetal tissues. Furthermore, the signaling promoted by the periodontopathogens in gingival tissues and other sites of infection in the body contributes to the release of additional inflammatory mediators, which are spread systemically. This shift to an inflammatory environment not only activates labor but also leads to PE and restricts intrauterine growth.

EFFECT OF PERIODONTAL TREATMENT ON GESTATIONAL ALTERATIONS

The effect of periodontal treatment on preventing gestational alterations is another controversial issue. Given the evidences associating periodontitis and gestational complications, various intervention studies were performed in order to determinate the effect of periodontal treatment on pregnancy outcomes. Studies on the effect of non-surgical mechanical treatment in pregnant women with gingival inflammation but limited periodontal destruction indicated an improvement in clinical parameters and a decrease in GCF inflammatory markers, but resulted in no significant differences in gestational outcomes such as PT birth and/or low weight at birth (123, 124). One exception was a study conducted in Chile, where the treatment of pregnant women with gingivitis resulted in a reduction in PT and LBW (125).

Since the link between periodontitis and pregnancy outcomes seems to be the result of spread of bacteria and their factors to extra-oral sites, and the consequent inflammatory burden induced by the pathogens, it seems reasonable that the periodontal treatment would provide better benefits to pregnancy to patients with severe periodontitis than to those with only gingivitis. This issue seems especially relevant due to the age of women enrolled in large randomized populational studies (18–35 years), since severe periodontitis comprised a very low percentage of participants.

The prevalence of PT births was reduced in women with severe periodontitis that received periodontal treatment (125–128). These data contradict other reports, where no positive effects of periodontal treatment on pregnancy outcomes were observed (129–132).

Several systematic reviews with meta-analysis on the effect of maternal periodontal treatment and risk for PT birth and/or low birth weight did not indicate a decreased risk after treatment (69, 133–135). However, one review suggested a significant effect in reducing the risk of PT birth for scaling and root planning in pregnant women with periodontitis for groups with high risk of PT birth (136).

The conflicting data on the effect of periodontal therapy in preventing PT birth/low birth weight are probably due to differences in diagnostic criteria of periodontitis, and other conditions common to both such as smoking, age, and ethnicity. In some studies, only gingivitis patients were enrolled (125). Furthermore, differences in disease severity and extension may have accounted for differences in benefits in gestation outcomes promoted by treatment. For instance, in the study of Offenbacher et al. (126), which reported the beneficial effects of the periodontal treatment on gestational outcomes, periodontitis patients had at least two sites in different teeth with PD $\geq$5 mm and evidence of attachment loss. On the other hand, in another study where treatment provided no positive effect for gestation, periodontitis was classified as $\geq$3 mm of PD in $\geq$3 teeth (137).

The studies differed also in treatment strategies. After supra and subgingival mechanical treatment, patients received monthly periodontal maintenance (129), while in others follow-up was not mentioned (137). An early study conducted in Chile reported that the non-surgical periodontal treatment during pregnancy resulted in a reduction in PT and LBW from 10.11% in the control group to 1.84% in the test group (138). However, women with severe periodontitis in the treatment group were submitted to metronidazole and amoxicillin administration, which may have controlled not only the oral microbiota but may also have affected infecting agents in other sites.

Other differences refer to the control groups. In most studies, the control group received no periodontal treatment during pregnancy (123, 125, 128, 138), which was postponed after the delivery. One study had no control group for comparison (124), while in another (137), the control group received supragingival prophylaxis, which may have altered inflammation levels and proportions of pathogens, especially in shallow pockets.

Other limitations of these interventional studies include the pooling of periodontitis patients with different extension, severity, and progression rates in a single group. As discussed above, the microbiota and immune response differ between aggressive and chronic periodontitis patients, and possibly their effects on pregnancy outcomes may also differ.

The period of gestation for the periodontal intervention should also be taken into account when discussing the effect of periodontal treatment in gestational outcomes. One study reported that the periodontal treatment during the second trimester of pregnancy led to a reduction of 3.8 times in the risk of PT delivery compared with the group receiving treatment after birth (128). However, there are no data comparing the effect of treatment prior or at the first month of gestation with that performed at later stages, and most studies reported only that patients were selected before a certain gestational age, such as 14–20 weeks gestation. The placenta microbiome study showed that even placenta from periodontally healthy women may be colonized by oral organisms (28). Animal model studies indicated that gestational outcomes including low weight of the fetus are dependent on the period of infection, and an acute infection immediately before conception or at the middle of the gestation led to more severe damage to the fetus than infection at the beginning of gestation (119). Human and animal studies

reported a microbial shift toward a more pathogenic microbiota in subgingival sites of periodontitis patients throughout the gestational period. Thus, one could assume that earlier periodontal treatment during pregnancy (or even before it) would be more beneficial than the treatment performed at the last trimester of gestation.

The effect of periodontal treatment on the prevention of PT delivery and other complications during pregnancy may be influenced by its effect on the bacterial load/composition and on the host inflammatory response. Infections in the lower genital tract have been associated with PT labor. Nevertheless, antibiotic treatment of asymptomatic women with bacterial vaginosis has not reduced the rate of PT delivery (3). Thus, other unknown genetic factors leading to increased susceptibility to the infection, to an abnormal response, and/or to PT labor may also play a role.

Gestation is a relatively short physiological process considering a chronic disease such as periodontitis. It is clear from most studies that periodontal treatment is able to improve clinical parameters of periodontitis (42, 123, 124, 131, 136); however, its effects on gestational outcomes involve several variables, making it hard to clearly evaluate the effect of periodontal treatment.

Despite the evidences associating PD with gestational outcomes, the effect of periodontal treatment in pregnancy is still not supported by scientific evidences. Periodontal treatment protocols providing the expected benefits for the mother and the fetus are still needed, and these should be tested in large randomized clinical trials. The periodontal treatment before pregnancy seems an option, since the severity of periodontitis and the virulence potential of the microbial community increase during pregnancy and the deleterious effects of the periodontal infection/inflammation to the fetus may occur even at very early stages of gestation.

CONCLUSION

Periodontitis are associated with induction of premature births and other gestational complications, which may compromise the subject throughout life. Periodontal pathogens may be involved in this process, directly inducing fetal abnormalities, or inducing the inflammatory response and the contraction of myocytes, inducing prematurity. However, there are still no data on differences induced by different oral microbial communities. Furthermore, the current data had not provided conclusive answers for the effect of periodontal treatment in preventing PT deliveries and other gestational complications, and definitive intervention protocols were not established.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank FAPESP (Process number: #2014/10549-2, #2011/10057-4, and #2012/01500-4) that provided scholarship to authors Marcela Yang Hui Zi, Priscila Larcher Longo, and Bruno Bueno-Silva, respectively.

REFERENCES

1. WHO. (2013). Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9280638327.pdf?ua=1
2. WHO. *Global Health Observatory Data Repository* (2014). Available from: http://apps.who.int/gho/data/view.main.1730?lang=en
3. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science* (2014) **345**(6198):760–5. doi:10.1126/science.1251816
4. Wardlaw T, Blanc A, Zupan J, Åhman E. Low Birthweight country, regional and global estimates. UNICEF WHO (2004). Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9280638327.pdf?ua=1
5. Mikolajczyk RT, Zhang J, Betran AP, Souza JP, Rintaro M, Gülmezoglu AM, et al. A global reference for fetal-weight and birthweight percentiles. *Lancet* (2011) **377**(9780):1855–61. doi:10.1016/S0140-6736(11)60364-4
6. Lee AC, Katz J, Blencowe H, Cousens S, Kozuki N, Vogel JP, et al. National and regional estimates of term and preterm small-for-gestational-age in 138 low-income and middle-income countries in 2013. *Lancet Glob Health* (2013) **1**(1):e26–36. doi:10.1016/S2214-109X(13)70006-8
7. Figueras F, Figueras J, Meier E. Customized birthweight standards accurately predict perinatal morbidity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* (2007) **92**(4):F277–80. doi:10.1136/adc.2006.108621
8. Katz J, Lee AC, Kozuki N, Lawn JE, Cousens S, Blencowe H, et al. Mortality risk in preterm and small-for-gestational-age infants in low-income and middle-income countries: a pooled country analysis. *Lancet* (2013) **382**(9890):417–25. doi:10.1016/S0140-6736(13)60993-9
9. Klimova RR, Malinovskaia VV, Parshina OV, Guseva TS, Novikova SV, Torshina ZV, et al. The effect of viral infections on the cytokine profile in pregnant women with obstetric complications and immunotherapy with human alpha2b interferon. *Vopr Virusol* (2013) **58**(1):18–23.
10. Peoples MD, Siegal E. Measuring the impact of programs for mothers and infants on prenatal care and low birth weight: the value of refined analysis. *Med Care* (1983) **21**(6):586–608. doi:10.1097/00005650-198306000-00002
11. Huck O, Tenenbaum H, Davideau JL. Relationship between periodontal diseases and preterm birth: recent epidemiological and biological data. *J Pregnancy* (2011) **2011**:164654. doi:10.1155/2011/164654
12. Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract* (2013) **22**(Suppl 1):8–19. doi:10.1159/000354200
13. Zenclussen AC. Adaptive immune responses during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* (2013) **69**(4):291–303. doi:10.1111/aji.12097
14. Piccinni MP, Scaletti C, Maggi E, Romagnani S. Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. *J Neuroimmunol* (2000) **109**(1):30–3. doi:10.1016/S0165-5728(00)00299-X
15. Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, et al. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol* (2002) **53**(1–2):241–56. doi:10.1016/S0165-0378(01)00119-X
16. Hayashi C, Gudino CV, Gibson FC, Genco CA. Pathogen-induced inflammation at sites distant from oral infection: bacterial persistence and induction of cell-specific innate immune inflammatory pathway. *Mol Oral Microbiol* (2010) **25**(5):305–16. doi:10.1111/j.2041-1014.2010.00582.x
17. Saito S, Nakashima A, Myojo-Higuma S, Shiozaki A. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol* (2008) **77**(1):14–22. doi:10.1016/j.jri.2007.04.007
18. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci* (2009) **16**(2):206–15. doi:10.1177/1933719108329095
19. Raghupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol* (2001) **13**(4):219–27. doi:10.1006/smim.2001.0316
20. Liu YS, Wu L, Tong XH, Wu LM, He GP, Zhou GX, et al. Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* (2011) **65**(5):503–11. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00921.x
21. Robertson SA, Prins JR, Sharkey DJ, Moldenhauer LM. Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation. *Am J Reprod Immunol* (2013) **69**(4):315–30. doi:10.1111/aji.12107
22. Du M, Piao H, Li D. The 3rd international conference on reproductive immunology in Shanghai: September 27-29, 2013. *Am J Reprod Immunol* (2014) **71**(3):203–9. doi:10.1111/aji.12187
23. Laird SM, Tuckerman EM, Cork BA, Linjawi S, Blakemore AI, Li TC. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* (2003) **9**(2):163–74. doi:10.1093/humupd/dmg013
24. Waldorf KMA, McAdams RM. Influence of infection during pregnancy on fetal development. *Reproduction* (2013) **146**(5):R151–62. doi:10.1530/REP-13-0232

25. Sobel JD. Gynecologic infections in human immunodeficiency virus-infected women. *Clin Infect Dis* (2000) **31**(5):1225–33. doi:10.1086/317436
26. Gibbs RS. The relationship between infections and adverse pregnancy outcomes: an overview. *Ann Periodontol* (2001) **6**(1):153–63. doi:10.1902/annals.2001.6.1.153
27. Stout MJ, Conlon B, Landeau M, Lee I, Bower C, Zhao Q, et al. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. *Am J Obstet Gynecol* (2013) **208**(3):226.e1–7. doi:10.1016/j.ajog.2013.01.018
28. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* (2014) **6**(237):287ra65. doi:10.1126/scitranslmed.3008599
29. Xiong X, Buekens P, Fraser WD, Beck J, Offenbacher S. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: a systematic review. *BJOG* (2006) **113**(2):135–43. doi:10.1111/j.1471-0528.2006.00968.x
30. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* (1999) **4**(1):1–6. doi:10.1902/annals.1999.4.1.1
31. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* (2010) **8**(7):481–90. doi:10.1038/nrmicro2337
32. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol* (2010) **8**(7):471–80. doi:10.1038/nrmicro2381
33. Nibali L, Farias BC, Vajgel A, Tu YK, Donos N. Tooth loss in aggressive periodontitis: a systematic review. *J Dent Res* (2013) **92**(10):868–75. doi:10.1177/0022034513501878
34. Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* (1999) **4**(1):39–53. doi:10.1902/annals.1999.4.1.39
35. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* (1998) **25**(2):134–44. doi:10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x
36. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* (2005) **38**:135–87. doi:10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x
37. Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* (2009) **36**(9):739–49. doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01449.x
38. Ando ES, De-Gennaro LA, Faveri M, Feres M, DiRienzo JM, Mayer MP. Immune response to cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in periodontitis patients. *J Periodontal Res* (2010) **45**(4):471–80. doi:10.1111/j.1600-0765.2009.01260.x
39. Saraiva L, Rebeis ES, Martins ED, Sekiguchi RT, Ando-Suguimoto ES, Mafra CE, et al. IgG sera levels against a subset of periodontopathogens and severity of disease in aggressive periodontitis patients: a cross-sectional study of selected pocket sites. *J Clin Periodontol* (2014) **41**(10):943–51. doi:10.1111/jcpe.12296
40. Pérez-Chaparro PJ, Gonçalves C, Figueiredo LC, Faveri M, Lobão E, Tamashiro N, et al. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *J Dent Res* (2014) **93**(9):846–58. doi:10.1177/0022034514542468
41. Hajishengallis G, Lambris JD. Complement and dysbiosis in periodontal disease. *Immunobiology* (2012) **217**(11):1111–6. doi:10.1016/j.imbio.2012.07.007
42. Finoti LS, Anovazzi G, Pigossi SC, Corbi SC, Teixeira SR, Braido GV, et al. Periodontopathogens levels and clinical response to periodontal therapy in individuals with the interleukin-4 haplotype associated with susceptibility to chronic periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2013) **32**(12):1501–9. doi:10.1007/s10096-013-1903-z
43. Gonçalves PF, Klepac-Ceraj V, Huang H, Paster BJ, Aukhil I, Wallet SM, et al. Correlation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* detection with clinical/immunoinflammatory profile of localized aggressive periodontitis using a 16S rRNA microarray method: a cross-sectional study. *PLoS One* (2013) **8**(12):e85066. doi:10.1371/journal.pone.0085066
44. Cairo F, Nieri M, Gori AM, Tonelli P, Branchi R, Castellani S, et al. Markers of systemic inflammation in periodontal patients: chronic versus aggressive periodontitis. An explorative cross-sectional study. *Eur J Oral Implantol* (2010) **3**(2):147–53.
45. Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res* (2003) **38**(2):210–7. doi:10.1034/j.1600-0765.2003.02012.x
46. Lima PM, Souza PE, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. Aggressive and chronic periodontitis correlate with distinct cellular sources of key immunoregulatory cytokines. *J Periodontol* (2011) **82**(1):86–95. doi:10.1902/jop.2010.100248
47. Shaker OG, Ghallab NA. IL-17 and IL-11 GCF levels in aggressive and chronic periodontitis patients: relation to PCR bacterial detection. *Mediators Inflamm* (2012) **2012**:174764. doi:10.1155/2012/174764
48. Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, et al. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol* (2003) **170**(5):2655–62. doi:10.4049/jimmunol.170.5.2655
49. Suga K, Saitoh M, Kokubo S, Nozaki K, Fukushima S, Yasuda S, et al. Synergism between interleukin-11 and bone morphogenetic protein-2 in the healing of segmental bone defects in a rabbit model. *J Interferon Cytokine Res* (2004) **24**(6):343–9. doi:10.1089/107999004323142204
50. Carrillo-de-Albornoz A, Figuero E, Herrera D, Bascones-Martínez A. Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol* (2010) **37**(3):230–40. doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01514.x
51. Gürsoy M, Pajukanta R, Sorsa T, Könönen E. Clinical changes in periodontium during pregnancy and post-partum. *J Clin Periodontol* (2008) **35**(7):576–83. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01236.x
52. Kornman KS, Loesche WJ. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis. Infect Immun* (1982) **35**(1):256–63.
53. Adriaens LM, Alessandri R, Spörri S, Lang NP, Persson GR. Does pregnancy have an impact on the subgingival microbiota. *J Periodontol* (2009) **80**(1):72–81. doi:10.1902/jop.2009.080012
54. Lin D, Moss K, Beck JD, Hefti A, Offenbacher S. Persistantly high levels of periodontal pathogens associated with preterm pregnancy outcome. *J Periodontol* (2007) **78**:833–41. doi:10.1902/jop.2007.060201
55. Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Bäckhed HK, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* (2012) **150**(3):470–80. doi:10.1016/j.cell.2012.07.008
56. Lunardelli AN, Peres MA. Is there an association between periodontal disease, prematurity and low birth weight? A population-based study. *J Clin Periodontol* (2005) **32**(9):938–46. doi:10.1111/j.1600-051X.2005.00759.x
57. Siqueira FM, Cota LO, Costa JE, Haddad JP, Lana AM, Costa FO. Intrauterine growth restriction, low birth weight, and preterm birth: adverse pregnancy outcomes and their association with maternal periodontitis. *J Periodontol* (2007) **78**(12):2266–76. doi:10.1902/jop.2007.070196
58. Moutsopoulos NM, Madianos PN. Low-grade inflammationin chronic infectious diseases: paradigm of periodontal infections. *Ann N Y Acad Sci* (2006) **1088**:251–64. doi:10.1196/annals.1366.032
59. Bassani DG, Olinto MT, Kreiger N. Periodontal disease and perinatal outcomes: a case-control study. *J Clin Periodontol* (2007) **34**(1):31–9. doi:10.1111/j.1600-051X.2006.01012.x
60. Vettore MV, Leal MD, Leão AT, da Silva AM, Lamarca GA, Sheiham A. The relationship between periodontitis and preterm low birthweight. *J Dent Res* (2008) **87**(1):73–8. doi:10.1177/154405910808700113
61. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol* (1996) **67**(10S):1103–13. doi:10.1902/jop.1996.67.10.1103
62. Varshney S, Gautam A. Poor periodontal health as a risk factor for development of pre-eclampsia in pregnant women. *J Indian Soc Periodontol* (2014) **18**(3):321–5. doi:10.4103/0972-124X.134569
63. Haerian-Ardakani A, Eslami Z, Rashidi-Meibodi F, Haerian A, Dallalnejad P, Shekari M, et al. Relationship between maternal periodontal disease and low birth weight babies. *Iran J Reprod Med* (2013) **11**(8):625–30.
64. Boggess KA, Lieff S, Murtha AP, Moss K, Beck J, Offenbacher S. Maternal periodontal disease is associated with an increased risk for preeclampsia. *Obstet Gynecol* (2003) **101**(2):227–31. doi:10.1016/S0029-7844(02)02314-1
65. Alchalabi HA, Habashneh RA, Jabali OA, Khader YS. Association between periodontal disease and adverse pregnancy outcomes in a cohort of pregnant women in Jordan. *Clin Exp Obstet Gynecol* (2013) **40**(3):399–402.
66. Kothiwale SV, Desai BR, Kothiwale VA, Gandhid M, Konin S. Periodontal disease as a potential risk factor for low birth weight and reduced maternal haemomglobin levels. *Oral Health Prev Dent* (2014) **12**(1):83–90. doi:10.3290/j.ohpd.a31224

67. Tellapragada C, Eshwara VK, Acharya S, Bhat P, Kamath A, Vishwanath S, et al. Prevalence of clinical periodontitis and putative periodontal pathogens among south Indian pregnant women. *Int J Microbiol* (2014) **2014**:420149. doi:10.1155/2014/420149
68. Ha JE, Jun JK, Ko HJ, Paik DI, Bae KH. Association between periodontitis and preeclampsia in never-smokers: a prospective study. *J Clin Periodontol* (2014) **41**(9):869–74. doi:10.1111/jcpe.12281
69. Chambrone L, Guglielmetti MR, Pannuti CM, Chambrone LA. Evidence grade associating periodontitis to preterm birth and/or low birth weight: I. A systematic review of prospective cohort studies. *J Clin Periodontol* (2011) **38**(9):795–808. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01755.x
70. Corbella S, Taschieri S, Francetti L, De Siena F, Del Fabbro M. Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Odontology* (2012) **100**(2):232–40. doi:10.1007/s10266-011-0036-z
71. Konopka T, Paradowska-Stolarz A. Periodontitis and risk of preterm birth and low birthweight-a meta-analysis. *Ginekol Pol* (2012) **83**(6):446–53.
72. Wei BJ, Chen YJ, Yu L, Wu B. Periodontal disease and risk of preeclampsia: a meta-analysis of observational studies. *PLoS One* (2013) **8**(8):e70901. doi:10.1371/journal.pone.0070901
73. Sgolastra F, Petrucci A, Severino A, Gatto R, Monaco A. Relationship between periodontitis and pre-eclampsia: a meta-analysis. *PLoS One* (2013) **8**(8):e71387. doi:10.1371/journal.pone.0071387
74. Gomes-Filho IS, Cruz SS, Rezende EJ, Dos Santos CA, Soledade KR, Magalhães MA, et al. Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight. *J Clin Periodontol* (2007) **34**(11):957–63. doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01141.x
75. Manau C, Echeverria A, Agueda A, Guerrero A, Echeverria JJ. Periodontal disease definition may determine the association between periodontitis and pregnancy outcomes. *J Clin Periodontol* (2008) **35**(5):385–97. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01222.x
76. Poole S, Singhrao SK, Kesavalu L, Curtis MA, Crean S. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *J Alzheimers Dis* (2013) **36**(4):665–77. doi:10.3233/JAD-121918
77. Moskovitz M, Birenboim R, Katz-Sagi H, Perles Z, Averbuch D. A brain abscess of probable odontogenic origin in a child with cyanotic heart disease. *Pediatr Dent* (2012) **85**(3):465–77.
78. Rahamat-Langendoen JC, van Vonderen MG, Engström LJ, Manson WL, van Winkelhoff AJ, Mooi-Kokenberg EA. Brain abscess associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: case report and review of literature. *J Clin Periodontol* (2011) **38**(8):702–6. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01737.x
79. Padilla C, Lobos O, Hubert E, González C, Matus S, Pereira M, et al. Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* (2006) **41**(4):350–3. doi:10.1111/j.1600-0765.2006.00882.x
80. Calandrini CA, Ribeiro AC, Gonnelli AC, Ota-Tsuzuki C, Rangel LP, Saba-Chujfi E, et al. Microbial composition of atherosclerotic plaques. *Oral Dis* (2013) **20**(3):e128–34. doi:10.1111/odi.12205
81. Gonzales-Marin C, Spratt DA, Millar MR, Simmonds M, Kempley ST, Allaker RP. Identification of bacteria and potential sources in neonates at risk of infection delivered by caesarean and vaginal birth. *J Med Microbiol* (2012) **61**(Pt 1):31–41. doi:10.1099/jmm.0.034926-0
82. Hillier S, Krohn M, Rabe L, Klebanoff S, Eschenbach D. The normal vaginal flora, H_2O_2-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin Infect Dis* (1993) **16**:S273–81. doi:10.1093/clinids/16.Supplement_4.S273
83. Gonzales-Marin C, Spratt DA, Millar MR, Simmonds M, Kempley ST, Allaker RP. Levels of periodontal pathogens in neonatal gastric aspirates and possible maternal sites of origin. *Mol Oral Microbiol* (2011) **26**(5):277–90. doi:10.1111/j.2041-1014.2011.00616.x
84. Gonzales-Marin C, Spratt DA, Allaker RP. Maternal oral origin of *Fusobacterium nucleatum* in adverse pregnancy outcomes as determined using the 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer region. *J Med Microbiol* (2013) **62**(Pt 1):133–44. doi:10.1099/jmm.0.049452-0
85. Gonçalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* (2002) **8**(1):3–13. doi:10.1002/mrdd.10008
86. Barak S, Oettinger-Barak O, Machtei E, Sprecher H, Ohel G. Evidence of periopathogenic microorganisms in placentas of women with preeclampsia. *J Periodontol* (2007) **78**:670–6. doi:10.1902/jop.2007.060362
87. Katz J, Chegini N, Shiverick KT, Lamont RJ. Localization of *P. gingivalis* in preterm delivery placenta. *J Dent Res* (2009) **88**(6):575–8. doi:10.1177/0022034509338032
88. Fardini Y, Chung P, Dumm R, Joshi N, Han YW. Transmission of diverse oral bacteria to murine placenta: evidence for the oral microbiome as a potential source of intrauterine infection. *Infect Immun* (2010) **78**(4):1789–96. doi:10.1128/IAI.01395-09
89. Bearfield C, Davenport E, Sivapathasundaram V, Allaker R. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG* (2002) **109**(5):527–33. doi:10.1111/j.1471-0528.2002.01349.x
90. Liu H, Redline R, Han Y. *Fusobacterium nucleatum* induces fetal death in mice via stimulation of TLR4-mediated placental inflammatory response. *J Immunol* (2007) **179**(4):2501–8. doi:10.4049/jimmunol.179.8.5604-c
91. Han YW, Shen T, Chung P, Buhimschi IA, Buhimschi CS. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. *J Clin Microbiol* (2009) **47**(1):38–47. doi:10.1128/JCM.01206-08
92. Wang X, Buhimschi CS, Temoin S, Bhandari V, Han YW, Buhimschi IA. Comparative microbial analysis of paired amniotic fluid and cord blood from pregnancies complicated by preterm birth and early-onset neonatal sepsis. *PLoS One* (2013) **8**(2):e56131. doi:10.1371/journal.pone.0056131
93. Han YW, Wang X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *J Dent Res* (2013) **92**(6):485–91. doi:10.1177/0022034513487559
94. Esra E, Kenan E, Ozrur D, Deniz G, Ozgur O, Belgin A, et al. Evaluation of periodontal pathogens in amniotic fluid and the role of periodontal disease in preterm birth and low birth weight. *Acta Odontol Scand* (2013) **71**(3–4):553–9. doi:10.3109/00016357.2012.697576
95. Swati P, Thomas B, Vahab SA, Kapaettu S, Kushtagi P. Simultaneous detection of periodontal pathogens in subgingival plaque and placenta of women with hypertension in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* (2012) **285**(3):613–9. doi:10.1007/s00404-011-2012-9
96. Guleria I, Pollard JW. The trophoblast is a component of the innate immune system during pregnancy. *Nat Med* (2000) **6**(5):589–93. doi:10.1038/75074
97. Madianos PN, Lieff S, Murtha AP, Boggess KA, Auten RL, Beck JD. Maternal periodontitis and prematurity. Part II: maternal infection and fetal exposure. *Ann Periodontol* (2001) **6**(1):175–82. doi:10.1902/annals.2001.6.1.175
98. Dasanayake AP, Boyd D, Madianos PN, Offenbacher S, Hills E. The association between *Porphyromonas gingivalis*-specific maternal serum IgG and low birth weight. *J Periodontol* (2001) **72**(11):1491–7. doi:10.1902/jop.2001.72.11.1491
99. Holden JA, Attard TJ, Laughton KM, Mansell A, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. *Infect Immun* (2014) **82**(10):4190–203. doi:10.1128/IAI.02325-14
100. Fatemi K, Radvar M, Rezaee A, Rafatpanah H, Azangoo Khiavi H, Dadpour Y, et al. Comparison of relative TLR-2 and TLR-4 expression level of disease and healthy gingival tissue of smoking and non-smoking patients and periodontally healthy control patients. *Aust Dent J* (2013) **58**(3):315–20. doi:10.1111/adj.12089
101. Wang J, Zhang Y, Zhang H, Qu W, Lv J, Wang Y, et al. Increased sTREM-1 in pregnant women with premature rupture of membranes and subclinical chorioamnionitis. *Mol Med Rep* (2012) **5**(3):663–7. doi:10.3892/mmr.2011.710
102. Li L, Shi L, Yang X, Ren L, Yang J, Lin Y. Role of invariant natural killer T cells in lipopolysaccharide-induced pregnancy loss. *Cell Immunol* (2013) **286**(1–2):1–10. doi:10.1016/j.cellimm.2013.10.007
103. Faas MM, Schuiling GA, Baller JFW, Visscher CA, Bakker WW. A new animal model for human pre-eclampsia: ultra-low-dose endotoxin infusion in pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* (1994) **71**(1):158–64. doi:10.1016/0002-9378(94)90463-4
104. Brewster JA, Orsi NM, Gopichandran N, McShane P, Ekbote UV, Walker JJ. Gestational effects on host inflammatory response in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (2008) **140**(1):21–6. doi:10.1016/j.ejogrb.2007.12.020

105. D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, et al. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res* (2004) **83**(2):156–60. doi:10.1177/154405910408300214
106. Dahlgren J, Samuelsson AM, Jansson T, Holmang A. Interleukin-6 in the maternal circulation reaches the rat fetus in mid-gestation. *Pediatr Res* (2006) **60**(2):147–51. doi:10.1203/01.pdr.0000230026.74139.18
107. Beckmann I, Efraim SB, Vervoort M, Visser W, Wallenburg HC. Tumor necrosis factor-alpha in whole blood cultures of preeclamptic patients and healthy pregnant and nonpregnant women. *Hypertens Pregnancy* (2004) **23**(3):319–29. doi:10.1081/PRG-200030334
108. Hutchinson JL, Rajagopal SP, Yuan M, Norman JE. Lipopolysaccharide promotes contraction of uterine myocytes via activation of Rho/ROCK signaling pathways. *FASEB J* (2014) **28**(1):94–105. doi:10.1096/fj.13-237040
109. Giannone PJ, Schanbacher BL, Bauer JA, Reber KM. Effects of prenatal lipopolysaccharide exposure on epithelial development and function in newborn rat intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* (2006) **43**(3):284–90. doi:10.1097/01.mpg.0000232572.56397.d6
110. Giannone PJ, Nankervis CA, Richter JM, Schanbacher BL, Reber KM. Prenatal lipopolysaccharide increases postnatal intestinal injury in a rat model of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* (2009) **48**(3):276–82. doi:10.1097/MPG.0b013e31818936b8
111. Romero R, Yoon BH, Chaemsaithong P, Cortez J, Park CW, Gonzalez R, et al. Bacteria and endotoxin in meconium-stained amniotic fluid at term: could intra-amniotic infection cause meconium passage? *J Matern Fetal Neonatal Med* (2014) **27**(8):775–88. doi:10.3109/14767058.2013.844124
112. Krajewski P, Sieroszewski P, Kmiecik M, Chudzik A, Pokrzywnicka M, Kwiatkowska M, et al. Assessment of interleukin-6, interleukin-8 and interleukin-18 count in the serum of IUGR newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med* (2014) **27**(11):1142–5. doi:10.3109/14767058.2013.851186
113. Zaga-Clavellina V, Flores-Espinosa P, Pineda-Torres M, Sosa-González I, Vega-Sánchez R, Estrada-Gutierrez G, et al. Tissue-specific IL-10 secretion profile from term human fetal membranes stimulated with pathogenic microorganisms associated with preterm labor in a two-compartment tissue culture system. *J Matern Fetal Neonatal Med* (2014) **27**(13):1320–7. doi:10.3109/14767058.2013.857397
114. Belanger M, Reyes L, von Deneen K, Reinhard MK, Progulske-Fox A, Brown MB. Colonization of maternal and fetal tissues by *Porphyromonas gingivalis* is strain-dependent in a rodent animal model. *Am J Obstet Gynecol* (2008) **199**(1):e1–7. doi:10.1016/j.ajog.2007.11.067
115. Kunnen A, van Pampus M, Aarnoudse J, van der Schans C, Abbas F, Faas M. The effect of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on pregnancy in the rat. *Oral Dis* (2014) **20**(6):591–601. doi:10.1111/odi.12177
116. Han YW, Redline RW, Li M, Yin L, Hill GB, McCormic TS. *Fusobacterium nucleatum* induces premature and term still births in pregnant mice: implication of oral bacteria in pretermbirth. *Infect Immun* (2004) **72**(4):2272–9. doi:10.1128/IAI.72.4.2272-2279.2004
117. Collins JG, Windley HW, Arnold RR, Offenbacher S. Effects of a *Porphyromonas gingivalis* infection on inflammatory mediator response and pregnancy outcome in hamsters. *Infect Immun* (1994) **62**(10):4356–61.
118. Lin D, Smith MA, Champagne C, Elter J, Beck J, Offenbacher S. *Porphyromonas gingivalis* infection during pregnancy increases maternal tumor necrosis factor alpha, suppresses maternal interleukin-10, and enhances fetal growth restriction and resorption in mice. *Infect Immun* (2003) **71**(9):5156–62. doi:10.1128/IAI.71.9.5156-5162.2003
119. Michelin M, Teixeira S, Ando-Suguimoto E, Lucas S, Mayer M. *Porphyromonas gingivalis* infection at different gestation periods on fetus development and cytokines profile. *Oral Dis* (2012) **18**(7):648–54. doi:10.1111/j.1601-0825.2012.01917.x
120. Cappelli D, Steffen MJ, Holt SC, Ebersole JL. Periodontitis in pregnancy: clinical and serum antibody observations from a baboon model of ligature-induced disease. *J Periodontol* (2009) **80**(7):1154–65. doi:10.1902/jop.2009.080199
121. Ebersole JL, Steffen MJ, Holt SC, Kesavalu L, Chu L, Cappelli D. Systemic inflammatory responses in progressing periodontitis during pregnancy in a baboon model. *Clin Exp Immunol* (2010) **162**(3):550–9. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04202.x
122. Booney EA. Demystifying animal models of adverse pregnancy outcomes: touching bench and bedside. *Am J Reprod Immunol* (2013) **69**(6):567–84. doi:10.1111/aji.12102
123. Fiorini T, Susin C, da Rocha JM, Weidlich P, Vianna P, Moreira CH, et al. Effect of nonsurgical periodontal therapy on serum and gingival crevicular fluid cytokine levels during pregnancy and postpartum. *J Periodontal Res* (2013) **48**(1):126–33. doi:10.1111/j.1600-0765.2012.01513.x
124. Kaur M, Geisinger ML, Geurs NC, Griffin R, Vassilopoulos PJ, Vermeulen L, et al. Effect of intensive oral hygiene regimen during pregnancy on periodontal health, cytokine levels, and pregnancy outcomes: a pilot study. *J Periodontol* (2014) **85**(12):1684–92. doi:10.1902/jop.2014.140248
125. López NJ, Da Silva I, Ipinza J, Gutierrez J. Periodontal therapy reduces the rate of preterm low birth weight in women with pregnancy-associated gingivitis. *J Periodontol* (2005) **76**(11S):2144–53. doi:10.1902/jop.2005.76.11-S.2144
126. Offenbacher S, Lin D, Strauss R, McKaig R, Irving J, Barros SP, et al. Effects of periodontal therapy during pregnancy on periodontal status, biologic parameters, and pregnancy outcomes: a pilot study. *J Periodontol* (2006) **77**(12):2011–24. doi:10.1902/jop.2006.060047
127. Jeffcoat M, Parry S, Sammel M, Clothier B, Catlin A, Macones G. Periodontal infection and preterm birth: successful periodontal therapy reduces the risk of preterm birth. *BJOG* (2011) **118**(2):250–6. doi:10.1111/j.1471-0528.2010.02713.x
128. Offenbacher S, Lieff S, Boggess KA, Murtha AP, Madianos PN, Champagne CM, et al. Maternal periodontitis and prematurity. Part I: obstetric outcome of prematurity and growth restriction. *Ann Periodontol* (2011) **6**(1):164–74. doi:10.1902/annals.2001.6.1.164
129. Michalowicz BS, Hodges JS, DiAngelis AJ, Lupo VR, Novak MJ, Ferguson JE, et al. Treatment of periodontal disease and the risk of preterm birth. *N Engl J Med* (2006) **355**(18):1885–94. doi:10.1056/NEJMoa062249
130. Horton AL, Boggess KA. Periodontal disease and preterm birth. *Obstet Gynecol Clin North Am* (2012) **39**(1):17–23. doi:10.1016/j.ogc.2011.12.008
131. Xiong X, Buekens P, Goldenberg RL, Offenbacher S, Qian X. Optimal timing of periodontal disease treatment for prevention of adverse pregnancy outcomes: before or during pregnancy? *Am J Obstet Gynecol* (2011) **205**(2):111.e1–6. doi:10.1016/j.ajog.2011.03.017
132. Han YW. Oral health and adverse pregnancy outcomes – what's next? *J Dent Res* (2011) **90**(3):289–93. doi:10.1177/0022034510381905
133. Polyzos NP, Polyzos IP, Zavos A, Valachis A, Mauri D, Papanikolaou EG, et al. Obstetric outcomes after treatment of periodontal disease during pregnancy: systematic review and meta-analysis. *BMJ* (2010) **29**(341):c7017. doi:10.1136/bmj.c7017
134. Baccaglini L. A meta-analysis of randomized controlled trials shows no evidence that periodontal treatment during pregnancy prevents adverse pregnancy outcomes. *J Am Dent Assoc* (2011) **142**(10):1192–3. doi:10.14219/jada.archive.2011.0089
135. Rosa MI, Pires PD, Medeiros LR, Edelweiss MI, Martínez-Mesa J. Periodontal disease treatment and risk of preterm birth: a systematic review and meta-analysis. *Cad Saude Publica* (2012) **28**(10):1823–33. doi:10.1590/S0102-311X2012001000002
136. Kim AJ, Lo AJ, Pullin DA, Thornton-Johnson DS, Karimbux NY. Scaling and root planning treatment for periodontitis to reduce preterm birth and low birth weight: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Periodontol* (2012) **83**(12):1508–19. doi:10.1902/jop.2012.110636
137. Macones GA, Parry S, Nelson DB, Strauss JF, Ludmir J, Cohen AW, et al. Treatment of localized periodontal disease in pregnancy does not reduce the occurrence of preterm birth: results from the periodontal infections and prematurity study (PIPS). *Am J Obstet Gynecol* (2010) **202**(2):147.e1–8. doi:10.1016/j.ajog.2009.10.892
138. López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol* (2002) **3**(8):911–24. doi:10.1902/jop.2002.73.8.911

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 30 August 2014; accepted: 14 December 2014; published online: 29 January 2015.
Citation: Zi MYH, Longo PL, Bueno-Silva B and Mayer MPA (2015) Mechanisms involved in the association between periodontitis and complications in pregnancy. Front. Public Health ***2****:290. doi: 10.3389/fpubh.2014.00290*
This article was submitted to Public Health Education and Promotion, a section of the journal Frontiers in Public Health.

Copyright © 2015 Zi, Longo, Bueno-Silva and Mayer. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.