

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

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 (10^8 UFC) 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 10^9 UFC 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-cimento 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), placenta (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-1 β , 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), placenta (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 equilíbrio 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 3rd, 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-1 β , 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.

Introdução

O nascimento prematuro é uma das principais causas de mortes em recém-nascidos (nas primeiras 4 semanas de vida) (World Health Organization – 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抗ígenos 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抗ígenos 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 (cimento, 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-deoxicronato 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 exacerbção 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抗ígenos 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 gravidez 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 Proteobactéria 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 induz 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抗ígenos 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- inflamatória 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-1 β , 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.

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-17 α , 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-1 β , 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, placenta 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 equilíbrio 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 sphaeroides inhibits neutrophil responses to LPS by blocking receptor recognition of LPS and by depleting LPS- binding protein in plasma. *J. Leukoc Biol.* 1995;58: 675-82.
- Alabdulmohsen W, Rozario SD, Markowitz K, Fine DH, Velliayagounder 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 diseases 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, Tsagbe 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-Chufi 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, Gandy 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, Krishnan 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, Gono-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 accurately 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, Velliagounder 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 outcomes: 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, Liang 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 diseases 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, Jauhainen 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.

Kaijya 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):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, Torschina 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 pregnancy. *Cell*. 2012;150(3):470–80.

Kornman KS, Loesche WJ. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides 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, Buccarelli 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. *Porphyromonas 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-leungh 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-Sugimoto 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 aggressive 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, Donnio PY, Bonnaure-Mallet M. Genotypic characterization of *Porphyromonas gingivalis* isolated from subgingival plaque and blood sample in positive bacteremia subjects with periodontitis. *J Clin Periodontol.* 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 preeclampsia.

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 via receptores de cininas do subtipo B₂. 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, Tsagbe 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 Clin Periodontol. 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, Jauhainen 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, Creatas 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, Järne 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 conditions 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.