



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**SUSCETIBILIDADE GENÉTICA ÀS DOENÇAS ORAIS DE  
ETIOLOGIA MICROBIANA**

Trabalho submetido por  
**Susana Maria Lopes Lérias**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**outubro de 2016**





**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**SUSCETIBILIDADE GENÉTICA ÀS DOENÇAS ORAIS DE  
ETIOLOGIA MICROBIANA**

Trabalho submetido por  
**Susana Maria Lopes Lérias**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Professor Doutor Nuno Taveira**

**outubro de 2016**



## **Dedicatória**

Dedico este trabalho à minha avó Aniceta, avô Lérias e avô Manuel, que não podem presenciar este importante momento da minha vida. Fizeram parte do meu incentivo e empenho pelos valores que me transmitiram e estão sempre presentes no meu pensamento com muito carinho.



## **Agradecimentos**

Este trabalho, que representa o culminar de cinco anos, não teria sido possível se não tivesse o apoio dos demais, a quem eu presto os meus sentidos agradecimentos:

Em primeiro lugar ao meu orientador, Professor Doutor Nuno Taveira, por ter aceitado orientar este trabalho, por toda a disponibilidade prestada e pela minúcia e rigor que me incutiu na elaboração deste projeto.

Aos meus pais, por serem um exemplo a seguir para mim, e por serem os grandes pilares da minha vida. Agradeço o apoio incondicional e toda a coragem e determinação que me dão e por acreditarem sempre em mim.

À minha avó Perpétua, que é um marco muito presente na minha vida, sempre pronta a dar toda a sua atenção e carinho. Pude sempre contar com o seu apoio incondicional, que tanto me ajudou na conclusão desta etapa.

Aos amigos que conheci nesta etapa e que quero levar para a vida: Rita, Margarida, Pipa, André, Inês, Joana e Helga. Foram sem dúvida uma fonte e apoio e inspiração, e fico muito feliz por poder partilhar esta fase com vocês e todas as que se seguirão.

Aos amigos de sempre e para sempre: Márcia, Filipa e Iras. São incontáveis as vivências partilhadas, e tenho muito orgulho de poder contar com pessoas tão especiais e que me fazem tão bem.

Ao André, por ser uma pessoa tão especial e querida para mim. Obrigada por todo o apoio incondicional, compreensão, paciência e motivação.



## 1. Resumo

A cavidade oral consiste num ecossistema extremamente diverso e dinâmico, habitado por microrganismos que se encontram numa relação simbiótica. Estes microrganismos organizam-se na placa bacteriana, que está em equilíbrio com a flora comensal e a resposta imunitária do hospedeiro. Quando este equilíbrio é perturbado, ocorre uma transição para uma população rica em agentes patogénicos, ativando a resposta imunitária do hospedeiro. Esta mudança no microbioma, designada disbiose, são as causadoras das doenças orais microbianas, nomeadamente a periodontite, infeções endodônticas, cárie, infeções fúngicas orais e infeções orais de etiologia viral.

Nos últimos anos surgiram numerosos métodos que permitiram a análise detalhada do genoma humano e possibilitaram a investigação de associações entre polimorfismos genéticos e doença oral de etiologia microbiana. A tese teve por objetivo rever este tema e baseou-se em artigos publicados entre 2013 e 2016.

Na periodontite, diferentes haplótipos para a IL-4 revelaram tornar o hospedeiro mais suscetível a esta doença, mediante a presença de bactérias periodontapogénicas, e o mesmo acontece com polimorfismos na IL1 ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Indivíduos com polimorfismos no recetor Toll-like 4 também parecem estar sujeitos a uma perda óssea alveolar mais acentuada. Várias associações ao genótipo do hospedeiro também foram verificadas nas restantes infeções.

Este trabalho de revisão de literatura envolveu a pesquisa de artigos publicados na Pubmed e B-on, tendo sido utilizadas as seguintes palavras-chave: polimorfismos, suscetibilidade genética, infeções da cavidade oral, microrganismos orais, defesas do hospedeiro.

**Palavras-chave:** Suscetibilidade genética; infeções da cavidade oral; polimorfismo; microrganismos orais



## 2. Abstract

The oral cavity consists of an extremely diverse and dynamic ecosystem, inhabited by microorganisms that find themselves in a symbiotic relation. These microorganisms organize themselves in the dental plaque, which is in balance with the commensal flora and the immunity response of the host. When this balance is disrupted, a transition occurs in the rich population of pathogenic agents, activating an immune response from the host. This microbiome change, designated as dysbiosis, is responsible for oral microbiome diseases, namely, periodontitis, endodontic infections, tooth decay, fungal oral infections and viral etiology oral infections.

In the last years, numerous methods have surfaced that allow the detailed analysis of the human genome and enable the investigation of association between genetic polymorphisms and the oral disease of microbial etiology. The thesis had the goal of revising this theme and was based of published articles between 2013 and 2016.

In periodontitis, different haplotypes for the IL-4 revealed that the host becomes more susceptible to this disease, through the presence of periodontopathogenic bacteria and the same happens with polymorphisms in the IL1 ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Subjects with polymorphisms in the receptor Toll-like 4 also seem to face an increased alveolar bone loss. Several associations to the host's genotype were also verified in the remaining infections.

This review involved the research of published articles in Pubmed and B-on, having been utilized the following key words: polymorphisms, genetic susceptibility, oral cavity infections, oral microorganisms, host defenses

**Keywords:** Genetic Susceptibility, oral cavity infections, polymorphisms, oral microorganisms.



## Índice Geral

1. Resumo.....	1
2. Abstract.....	3
3. Índice de Figuras.....	7
4. Índice de Tabelas.....	9
5. Lista de abreviaturas e acrónimos.....	10
6. Introdução.....	12
6.1. Ecossistema oral.....	12
6.1.1. Cavidade oral como habitat de microrganismos.....	12
6.1.2. Microbioma oral em situação de saúde e doença.....	13
6.1.3. Desenvolvimento do biofilme oral ao longo da vida.....	17
6.2. Genética do hospedeiro e o seu impacto potencial na patologia de etiologia microbiana.....	19
7. Suscetibilidade genética à patologia oral de etiologia microbiana.....	22
7.1. Suscetibilidade genética à doença periodontal.....	22
7.2. Suscetibilidade genética a infeções endodônticas.....	32
7.3. Suscetibilidade genética à cárie.....	36
7.4. Suscetibilidade genética a infeções fúngicas orais.....	43
7.5. Suscetibilidade genética às infeções orais de etiologia viral.....	45
8. Epigenética e a sua influencia na suscetibilidade genética do hospedeiro às infeções orais de etiologia microbiana.....	51
9. Conclusão.....	56
10. Bibliografia.....	58

### 3. Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Variação na composição de bactérias no sulco gengival no 3º quadrante a vestibular (esquerda) e a lingual (direita).....	15
<b>Figura 2</b> - Modelo espaço-temporal da colonização bacteriana oral.....	16
<b>Figura 3</b> – Potenciais vias patogénicas da disbiose de causas genéticas.....	20
<b>Figura 4</b> – Microrganismos patogénicos encontrados no fluido gengival dos indivíduos com periodontite.....	22
<b>Figura 5</b> – Interação dos componentes imunes na inflamação periodontal que leva à perda óssea.....	23
<b>Figura 6</b> – Periodontite induzida no hospedeiro suscetível pela comunidade microbiana.....	24
<b>Figura 7</b> – Esquema das patologias associadas á interação entre microrganismos e hospedeiro na doença periodontal.....	25
<b>Figura 8</b> – Perda óssea alveolar em sujeitos que possuem o wild type e genótipo heterozigótico TL4 de acordo com a presença de <i>P. gingivalis</i> . As diferenças significativas entre os grupos estão marcadas com o valor de <i>p</i> .....	30
<b>Figura 9</b> – perda óssea alveolar em sujeitos que possuem o wild type e genótipo heterozigótico e homozigótico TL9 de acordo com a presença de <i>P. gingivalis</i> . As diferenças significativas entre os grupos estão marcadas com o valor de <i>p</i> .....	30
<b>Figura 10</b> – Atividade antimicrobiana da saliva de sujeitos com genótipos LTF.....	37
<b>Figura 11</b> – Atividade anti <i>S. mutans</i> na saliva dos sujeitos com genótipos KK, RK e RR, e o efeito do pré-tratamento desta saliva com anticorpos para LTF.....	38
<b>Figura 12</b> – Efeitos do polimorfismo no KRT75 no esmalte.....	40
<b>Figura 13</b> – Projeções tubulares de fissuras nos molares formando pequenos orifícios na profundidade do esmalte.....	41
<b>Figura 14</b> – Coloração Gram de bactérias nos molares dos indivíduos portadores da mutação rs2232387.....	42

<b>Figura 15</b> – Regulação da interleucina 17, essencial à homeostase e imunidade oral...	44
<b>Figura 16</b> – Distribuição genotípica dos 5 polimorfismos.....	46
<b>Figura 17</b> – Regulação da célula NK pelo KIR.....	49
<b>Figura 18</b> – Sequencias metiladas do DNA nos locais CpG são causadoras de uma estrutura mais condensada.....	52
<b>Figura 19</b> – A acetilação das histonas resulta num formato aberto de cromatina; a desacetilação das histonas provoca uma maior condensação na cromatina.....	52
<b>Figura 20</b> – Grau de metilação dos promotores dos genes IL8, TGFBR2, MDR1 e RARB. Cada ponto representa a presença de hipermetilação do promotor de cada gene em particular na amostra saudável e na com tumor.....	54
<b>Figura 21</b> – conteúdo da subpopulação microbiana ao nível do filo da mucosa saudável e da porção com HNSCC. Cada barra representa uma amostra, e as divisões na barra mostram o seu conteúdo microbiano.....	54

#### 4. Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Contagem de cópias do gene 16S rRNA dos microrganismos em questão, em amostras de doença, saudáveis e de controlo (no início, e 45 e 90 dias depois do tratamento) IL4+ - indivíduos com haplótipo TCI/CCI IL4; IL4 - - indivíduos com haplótipo TTD/CTI IL 4.....	27
<b>Tabela 2</b> – Distribuição do polimorfismo IL1 $\beta$ .....	33
<b>Tabela 3</b> – Frequência do genótipo IL-8 em indivíduos com ASAP e CNAP.....	34
<b>Tabela 4</b> – Análise dos 3 polimorfismos dos haplótipos HLA-DP.....	47
<b>Tabela 5</b> – Associação entre alelos e genótipos HLA-G e a prevalência de infeção por HPV.....	48

## **5. Lista de abreviaturas e acrónimos**

**AMP** - péptido antimicrobiano

**ASAP** – periodontite apical aguda soporativa

**CMV** – citomegalovírus

**CNAP** – periodontite apical crónica não soporativa

**CpG** - citosina-fosfato-guanina

**IL** – interleucina

**HBsAg** - antígeno de superfície da hepatite B

**HLA** - antígenos de leucócitos humanos

**HCV** – vírus da hepatite C

**HNSCC** – carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço

**HPV** - vírus do papiloma humano

**HSV** – herpes vírus simplex

**KIR** - killer imunoglobulin-like

**LPS** – lipossacarídeo

**LTF** - lactoferrina

**MDR1** – multidrug resistance gene 1

**MMP** – metaloproteinases da matriz

**mRNA** – RNA mensageiro

**miRNA** – micro RNA

**NF** – fator nuclear

**NK** - natural killer

**PAMP** - padrões moleculares associados aos patogénicos

**PCR** – reação em cadeia da polimerase

**PMN** - neutrófilo polimorfonuclear

**Proteínas STAT** – Família de proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição

**PRP** - proteína rica em prolina

**PRR** - recetor de reconhecimento de padrão

**SAM**- s-adenosina metionina

**SNP** – polimorfismo de um único nucleótido

**TLR** – recetor tipo Toll

**TNF** – fator de necrose tumoral

## 6. Introdução

### 6.1. Ecossistema oral

#### 6.1.1. Cavidade oral como habitat de microrganismos

A cavidade oral consiste num ecossistema extremamente diverso e dinâmico, cujas condições ecológicas são algo instáveis, o que faz de si algo único no corpo humano. Esta instabilidade deve-se ao facto de o ambiente oral estar em constante mudança com a idade (as alterações vão surgindo desde os primeiros meses após o nascimento ou com a erupção dentária, por exemplo) e por estar exposto ao exterior, o que provoca consequentes alterações no microbioma (Struzycka, 2014).

Os microrganismos encontram-se numa relação simbiótica na cavidade oral, primeiramente nas crianças recém-nascidas, poucas horas após o nascimento. Um período de tempo depois, uma quantidade considerável de microrganismos diversos e complexos coloniza a cavidade oral, uma vez que aí têm o ambiente ecológico ideal para a reprodução: uma superfície húmida com abundância de nutrientes, temperatura ideal, uma superfície que permite a sua adesão (superfície dentária) bem como um potencial redox no sulco gengival que permite ambos os micróbios aeróbios e anaeróbios (Singh, Sharma, e Shreehari, 2015).

A definição mais simples para biofilme é “organismos a colonizarem uma superfície biótica ou abiótica, embebidos numa matriz rica em polímeros”, sendo a placa bacteriana um excelente exemplo de biofilme, já que é constituída por microrganismos da cavidade oral que crescem como parte de uma mistura de composição complexa estruturalmente, cujas espécies aderem a uma superfície (neste caso dentes e gengiva) (Lamont, Hajishengallis, e Jenkinson, 2014).

O biofilme oral tem duas funções principais: prevenir a colonização por parte de microrganismos patogénicos e educar o sistema imunitário a reconhecer os microrganismos comensais. Isto quer dizer que existe um equilíbrio entre a flora comensal e a resposta imunitária do hospedeiro num estado de saúde. No entanto, há circunstâncias que podem perturbar este equilíbrio na cavidade oral, como mudança de pH, alteração na tensão de oxigénio, na disponibilidade de nutrientes ou no estado imunitário, o que vai provocar uma transição da flora residente comensal para uma população rica em agentes

patogénicos que induz a resposta imunitária do hospedeiro. O biofilme oral assim modificado vai desencadear doenças orais, sendo necessário entender a ecologia da flora oral para explicar a etiologia destas doenças. (Kumar, 2013).

Um componente muito importante deste habitat é a saliva, uma secreção rica que contém diferentes tipos de ingredientes ativos biológicos. Estes ingredientes conferem propriedades antibacterianas, antivirais e antifúngicas à saliva. Possui proteínas como a lisozima (bacteriolise), lactoferrina (inibe o crescimento bacteriano), lactoperoxidase (bloqueia o metabolismo da glicose) e outras proteínas como mucinas, imunoglobulina A e glicoproteínas onde se incluem as glicoproteínas ricas em prolina (PRP's), as quais atuam como recetores permitindo a ligação entre as bactérias e a película adquirida que cobre a superfície do dente (Struzycka, 2014).

A cavidade oral contém uma membrana mucosa coberta de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado (como o palato) e não queratinizado (dorso da língua). Estes locais constituem nichos ecológicos separados, sendo que cada um tem um diferente microbioma (Struzycka, 2014).

#### 6.1.2. Microbioma oral em situação de saúde e doença

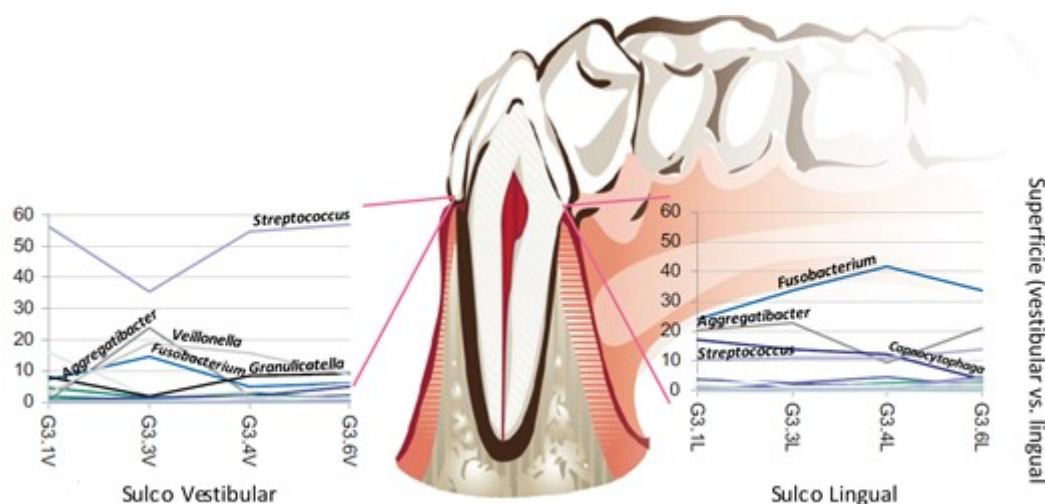
O sistema digestivo inicia-se na cavidade oral, onde os alimentos e microrganismos se juntam e misturam com a saliva. Neste ambiente vários nichos ecológicos podem ser identificados onde os microrganismos se organizam em comunidades (Costalonga e Herzberg, 2014). A boca é um nicho ecológico único do corpo humano, dada a sua vasta quantidade de tipos de superfícies: duras, moles, naturais e artificiais (esmalte, dentina, língua, gengiva, coroas acrílicas, aplicações ortodônticas, materiais restauradores). Apesar de estas superfícies serem banhadas pelo mesmo fluido, a saliva, o biofilme que se liga a cada uma difere na sua composição. Isto porque cada superfície apresenta um microambiente único, com características específicas, resultando numa variedade de composições microbianas que se ligam a cada uma (Steinberg, 2016).

As doenças orais microbianas são causadas por uma mudança no microbioma normal chamada **disbiose**. A disbiose pode resultar da presença de defeitos genéticos no hospedeiro que impedem o reconhecimento dos microrganismos patogénicos e a resposta do hospedeiro contra estes microrganismos patogénicos. A disbiose consiste assim numa

alteração no equilíbrio entre os órgãos de barreira (como por exemplo a pele, a mucosa intestinal e oral) e os seus microrganismos colonizadores. (Nibali, Henderson, Sadiq, e Donos, 2014; Nibali e Henderson, 2016).

As características biogeográficas consistem na variação da colonização dos diferentes locais da cavidade oral, sendo eles essencialmente os dentes, a língua, a mucosa, o sulco gengival e a saliva. No caso dos dentes, há até diferenças consideráveis na composição bacteriana caso estejamos a falar de superfícies linguais ou vestibulares. Isto porque as superfícies vestibulares contêm essencialmente *Streptococcus*, estando estes em 48,2% da superfície e 43,8% na zona correspondente do sulco gengival. Já nas superfícies linguais encontram-se em apenas 23,9% da superfície e 12,3% no sulco correspondente (Figura 1). Isto terá a ver com a percentagem de oxigénio nas diferentes localizações da boca, tendo em conta a alta proporção de anaeróbios estritos em localizações linguais, e aeróbios ou anaeróbios facultativos como *Streptococcus* em localizações vestibulares, mais expostas ao oxigénio (Simon-Soro et al., 2013).

A nível supragengival também se encontram *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* e *Lactobacillus*, enquanto a nível infragengival dominam bactérias anaeróbias gram negativas como *Actinobacillus*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* (Struzycka, 2014).

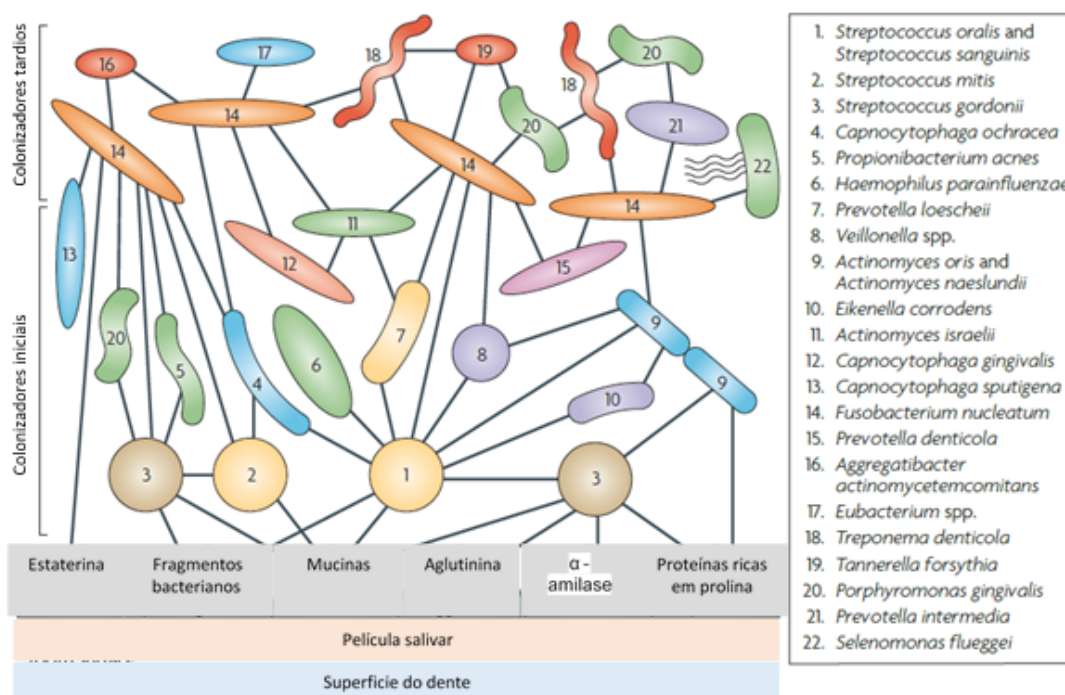


**Figura 1** – Variação na composição de bactérias no sulco gengival no 3º quadrante a vestibular (esquerda) e a lingual (direita). O primeiro número de cada letra refere-se ao quadrante, e o segundo número o dente (incisivo, 1; canino, 3; primeiro pré-molar, 4; primeiro molar, 6). V – vestibular; L – lingual. [adaptado de (Simon-Soro et al., 2013)].

Na mucosa oral há essencialmente cocos anaeróbios facultativos, estando os *Streptococcus mitis* em predominância. Também se observa significativamente a presença de *Veillonella*, *Prevotella* e *Haemophilus*. Já no dorso da língua predominam os *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguinis*, *Neisseria flavescens* e *Neisseria subflava*, bem como alguns anaeróbios estritos, como a *Veillonella* (Huttenhower et al., 2012; Hadfield e David, 2016; Krishnan, Chen, e Paster, 2016).

A microbiota comensal descrita tem um importante papel na manutenção da saúde oral. No entanto, em casos de doença, vai haver colonização por diferentes tipos de microrganismos. No caso da cárie, em que a produção de ácido (maioritariamente ácido láctico) leva a uma perturbação na capacidade tampão da saliva, vai haver alterações na composição da microbiota que favoreça bactérias acidúricas, particularmente *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*, que vão continuar a produção de ácido láctico provocando danos nas superfícies dentárias. Para além destas duas espécies, também membros do género *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* e *Scardovia* foram associados à cárie dentária. Na infeção endodôntica, ou seja, quando a lesão de cárie não é tratada e as bactérias chegam à polpa, estão particularmente associadas bactérias anaeróbias proteolíticas. Quando esta infeção persiste após o tratamento, frequentemente estão presentes *Enterococcus faecalis*. Por fim, a periodontite caracteriza-se pela perda de ligação entre o dente e a gengiva, formando a bolsa periodontal, que se torna abundantemente colonizada por bactérias anaeróbias, como *Porphyromonas gingivalis*,

*Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. Recentemente também foram associados à periodontite outros organismos como *Anaeroglobus geminatus*, *Eubacterium saphenum*, *Filifactor alocis*, *Porphyromonas endodontali* e *Prevotella denticola* (Wade, 2013).



**Figura 2** - Modelo espaço-temporal da colonização bacteriana oral. Reconhecimento dos receptores da película salivar pelos colonizadores iniciais *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sanguinis*. Os colonizadores tardios ligam-se aos colonizadores iniciais [adaptado de (Kolenbrander et al., 2010)].

Após a limpeza das superfícies dentárias, estas começam imediatamente a ser cobertas por uma variedade de constituintes salivares, como mucinas, proteínas ricas em prolina, alfa-amilase, aglutinina e fragmentos celulares bacterianos. Esta película vai então fornecer um número elevado de receptores, os quais serão reconhecidos pelas bactérias colonizadoras. Estes colonizadores primários são na sua maioria espécies de cocos Gram positivos que incluem *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus oralis* (Figura 2). A sua multiplicação vai criar condições favoráveis à colonização por bactérias mais patogénicas (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, e *Treponema denticola*), a maior parte anaeróbios estritos (Singh, Sharma, e Shreehari, 2015).

### 6.1.3. Desenvolvimento do biofilme oral ao longo da vida

Pouco depois do nascimento, a cavidade oral começa a ser colonizada por bactérias que vão formar comunidades designadas por biofilmes dentro de nichos específicos, como a língua, os dentes, o sulco gengival ou a mucosa gengival. Estudos moleculares indicam que residem na cavidade oral mais de 1000 espécies diferentes de microrganismos, e que cada indivíduo possui cerca de 200 espécies no seu microbioma oral, e estima-se ainda que 1mg de placa bacteriana contenha 10 bilhões de bactérias (Kumar, 2013).

O biofilme oral tem uma estrutura altamente ordenada e complexa, sendo criado pela sobreposição de camadas de microrganismos, na qual as espécies coexistem numa relação muito restrita entre si. Esta relação resulta numa associação, que é em parte produzida por adesinas de superfície que vão facilitar a colonização de várias espécies de microrganismos nos mesmos tecidos (Lamont et al., 2014; Struzycka, 2014). A capacidade de comunicação entre comunidades no biofilme é uma característica muito importante do biofilme, uma vez que as bactérias são capazes de identificar a natureza química do sinal e a sua concentração no ambiente, o que vai permitir o seu controlo fisiológico (dos processos metabólicos de toda a população) e crescimento específico. Ou seja, a regulação da sua expressão génica vai ser alterada quando em convivência com populações densas. Isto vai permitir que, por exemplo, na presença de resíduos metabólicos ou quando há diminuição de nutrientes, as bactérias mudem a sua atividade abrindo o metabolismo, de forma a se adaptarem à situação (Struzycka, 2014).

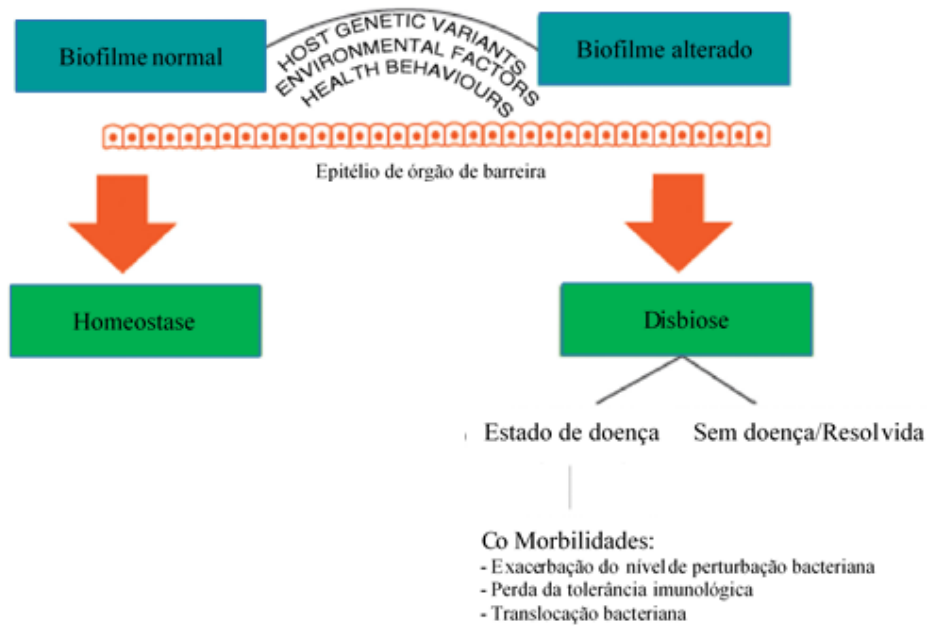
A formação e desenvolvimento do biofilme tem 3 passos: a ligação às estruturas da cavidade pelas espécies pioneiras iniciais (aqui o biofilme aumenta em massa, devido a esta colonização), coadesão e coagregação. (Struzycka, 2014).

É graças à comunicação entre espécies que o desenvolvimento do biofilme se considera um processo natural e facilitado. Isto porque os microrganismos vão produzir feromonas [por exemplo, a *E. faecalis* produz uma feromona designada cOB1 (adaptado de <http://phys.org/news/2015-05-pheromones-gut-bacteria-resistant-variants.html#jCp>)] que permitem a comunicação célula-a-célula, o que auxilia as bactérias causadoras do biofilme a unirem-se contra o stress externo. Este sistema de comunicação designa-se *Quorum Sensing*, em que cada bactéria produz uma molécula sinalizadora designada

“indutor” que vai ser reconhecida pelo recetor da bactéria seguinte. A ligação do indutor ao recetor ativa a transcrição de genes que são necessários à ativação do primeiro. O *Quorum Sensing* vai permitir que as bactérias se relacionem umas com as outras, e tem demonstrado a capacidade de dar respostas rápidas a mudanças ambientais, como a presenças de determinados nutrientes, produtos tóxicos ou bactérias patogénicas (Singh et al., 2015).

## 6.2 Genética do hospedeiro e seu impacto potencial na patologia oral de etiologia microbiana

As superfícies que se encontram em contacto com o ambiente exterior, como é o caso da cavidade oral, são inevitavelmente colonizadas por biofilmes. Variantes genéticas do hospedeiro que predispõem para uma resposta inflamatória excessiva, podem afetar diretamente a proliferação de alguns microrganismos do biofilme favorecendo, por exemplo, a multiplicação de bactérias patogénicas que crescem melhor neste meio, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* ou *Tannerella forsythia* (Nibali et al., 2014; Santiago-Rodriguez et al., 2015). O epitélio da cavidade oral atua como primeira linha de defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores, através da produção de citocinas (como por exemplo a interleucina 8 ou o TNF $\alpha$ , que são produzidos principalmente por leucócitos) e péptidos antimicrobianos (como a lactoferrina ou a defensina que são produzidas por células acinares e leucócitos respetivamente). Estes compostos permitem-lhe regular a normal homeostase entre hospedeiro e microrganismos comensais e patogénicos. Qualquer alteração genética que comprometa a função dos mediadores da resposta imunitária poderá levar a perda de tolerância imunológica para as bactérias comensais e consequente disbiose (disbiose de causa genética) que depois causa a doença oral (Figura 3) (Nibali et al., 2014; Nibali e Henderson, 2016).



**Figura 3** – Potenciais vias patogênicas da disbiose de causas genéticas. Vários fatores como variantes genéticas ou ambientais podem comprometer a função dos mediadores da resposta imunitária do hospedeiro, levando a uma perda de tolerância imunológica pelas bactérias comensais causando doença oral [adaptado de (Nibali et al., 2014)].

A maior parte das doenças genéticas são determinadas por polimorfismos de um único nucleótido (SNPs) em genes que codificam para proteínas que são capazes de desencadear ou amplificar as cascatas inflamatórias (Nibali e Henderson, 2016). Há também uma enorme variedade de recetores de reconhecimento padrão (PRRs) nas células do sistema imune que têm como função detetar padrões moleculares importantes existentes em microrganismos patogênicos (padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs), tais como os seus lipossacarídeos (LPS). Os PAMPs (que incluem o LPS das bactérias, por exemplo) vão desencadear uma rápida resposta imune através da produção de citocinas, o permite que o hospedeiro mantenha o balanço homeostático com o sistema imune, graças à deteção destes microrganismos, que vai permitir a sua manutenção e vigilância (Khan, Kong, Meiller, e Jabra-Rizk, 2015). Como consequência da ligação entre o microrganismo e os PRR existentes a nível celular (monócitos), a célula imunitária vai produzir citocinas pro inflamatórias ou anti inflamatórias. Quando ocorrem mutações na região do promotor, ou dos segmentos codificantes dos genes dos PRRs, vai ocorrer uma expressão alterada destes últimos ou então diferenças na capacidade para reconhecer os constituintes microbianos a que se ligam (Nibali et al., 2014; Nibali e Henderson, 2016).

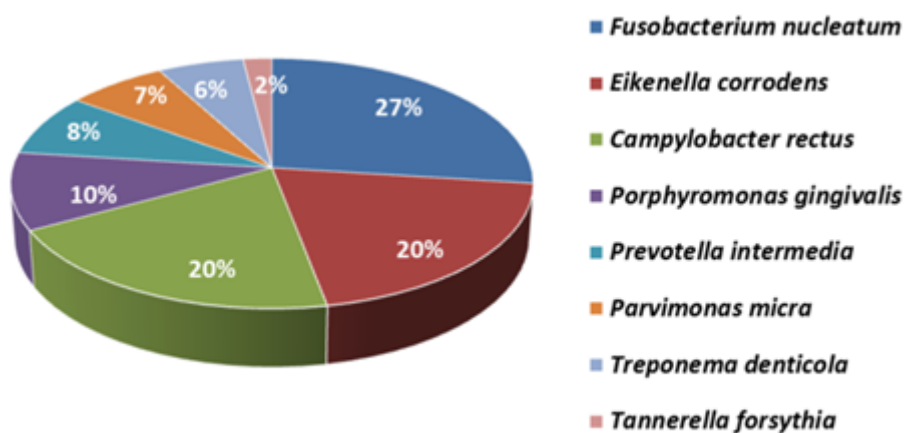
Para além de afetarem o crescimento bacteriano, as variações genéticas do hospedeiro são responsáveis pela criação de um ambiente favorável ao crescimento de bactérias patogénicas no biofilme, sendo que as variações genéticas que predis põem para uma resposta inflamatória específica, criam um ambiente favorável de bactérias que tenham características no seu metabolismo que lhes permitam crescer melhor neste tipo de ambientes. Assim, mutações em genes envolvidos em mecanismos regulatórios imunes, ou nas vias pro inflamatórias, podem levar a inflamações que descontrolam a microbiota, e favorecem o crescimento de microrganismos patogénico (Nibali et al., 2014).

Os polimorfismos genéticos que afetam a resposta inflamatória, como os genes da interleucina-1 e interleucina-6, estão associados à deteção de bactérias periodontopatogénicas no sulco gengival, o que leva a que hospedeiros portadores destes polimorfismos possuam uma mudança no sentido de uma microbiota mais patogénica. Também os genes do TLR-4 foram implicados na periodontite, bem como níveis elevados de citocinas pro inflamatórias como é o caso do TNF- $\alpha$  (Nibali et al., 2014; Nibali e Henderson, 2016).

## 7. Suscetibilidade genética à patologia oral de etiologia microbiana

### 7.1. Suscetibilidade genética à doença periodontal

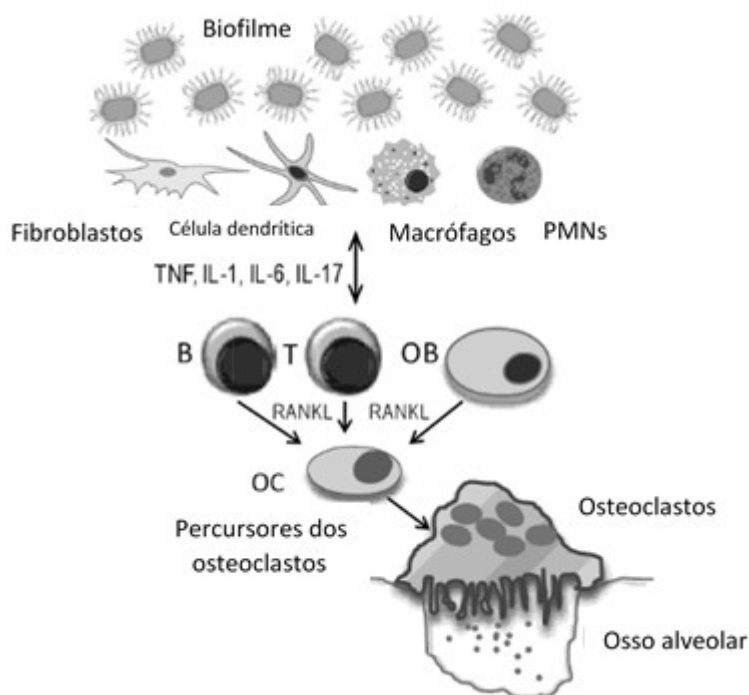
A periodontite resulta da interação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, agentes microbianos, e fatores genéticos e ambientais, sendo a sua etiologia multifatorial. A microbiota oral tem um especial papel no seu desenvolvimento, sendo que bactérias como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans* e *Treponema denticola* (Figura 4) estão quase sempre associadas à periodontite. A resposta imune do hospedeiro a estes microrganismos vai desencadear a expressão de citocinas, as quais caracterizam a imunopatologia da periodontite (Finoti et al., 2013; Santiago-Rodriguez et al., 2015).



**Figura 4** – Microrganismos patogênicos encontrados no fluido gengival dos indivíduos com periodontite. [adaptado de (Cantore et al., 2014)]

O tecido periodontal inflamado contém agregados linfóides nos quais estão presentes células imunes como as células dendríticas, fibroblastos, macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares (PMNs). Estas regulam a resposta imune adaptativa, ao ativarem os linfócitos T e B. No entanto isto trata-se de uma relação recíproca, pois as citocinas produzidas pelos linfócitos T podem ativar os PMNs e os fibroblastos, que vão reforçar a resposta inflamatória. As citocinas aqui produzidas, como TNF, IL-1, IL-6 e IL-17, estimulam o ligando do recetor ativador do fator nuclear KB (RANKL), que por

sua vez provoca a maturação osteoclástica e conseqüentemente a reabsorção óssea que pode levar à perda dentária (Figura 5) (Jakubovics e Palmer Jr, 2013).

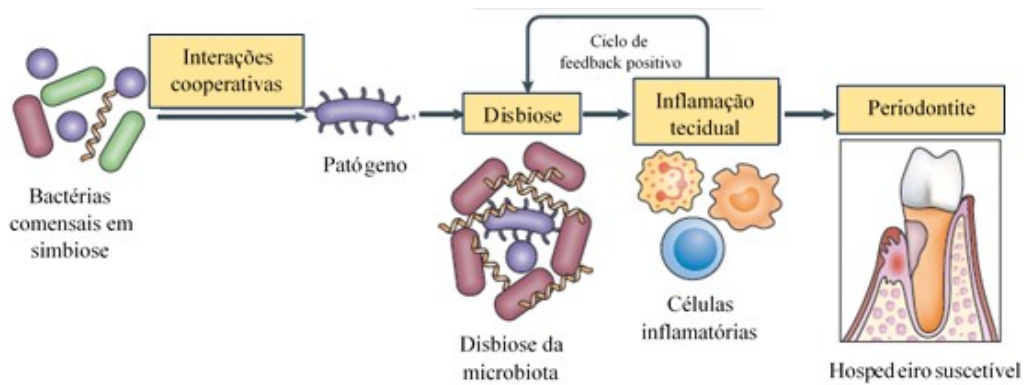


**Figura 5** – Interação dos componentes imunes na inflamação periodontal que leva à perda óssea. As células imunes (células dendríticas, fibroblastos, macrófagos e PMNs) presentes nos agregados linfoides do tecido inflamado são responsáveis pela regulação da resposta imune adaptativa. Vão ativar os linfócitos T e B, que por sua vez produzem citocinas que ativam os PMNs e os fibroblastos. As citocinas TNF, IL-1, IL-6 e IL-17 vão estimular o RANKL, em conjunto com os osteoblastos (OB) que por sua vez provocam a maturação osteoclástica (OC) levando à reabsorção óssea. ([adaptado de (Jakubovics e Palmer Jr, 2013)].

As citocinas são proteínas regulatórias de baixo peso molecular que atuam como mediadores na formação e controle da resposta imune e inflamatória. A interleucina (IL) 1 é uma citocina pro inflamatória que inclui duas moléculas diferentes mas similares na sua função: IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , cujos genes se encontram no cromossoma 2. A IL-1 tem um importante papel nos processos regulatórios e inflamatórios através da indução da expressão de outras proteínas efetoras como as metaloproteinases da matriz extracelular<sup>1</sup> (MMPs) (Cantore et al., 2014). A IL-1 $\alpha$  é um precursor de células que formam barreiras biológicas, tal como células epiteliais, queratinócitos ou células endoteliais. Esta citocina

<sup>1</sup> Rede complexa constituída por polissacarídeos, como os glicosaminoglicanos ou a celulose, e proteínas. É um elemento estrutural dos tecidos e influencia o seu desenvolvimento e fisiologia [adaptado de (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26810/>)]

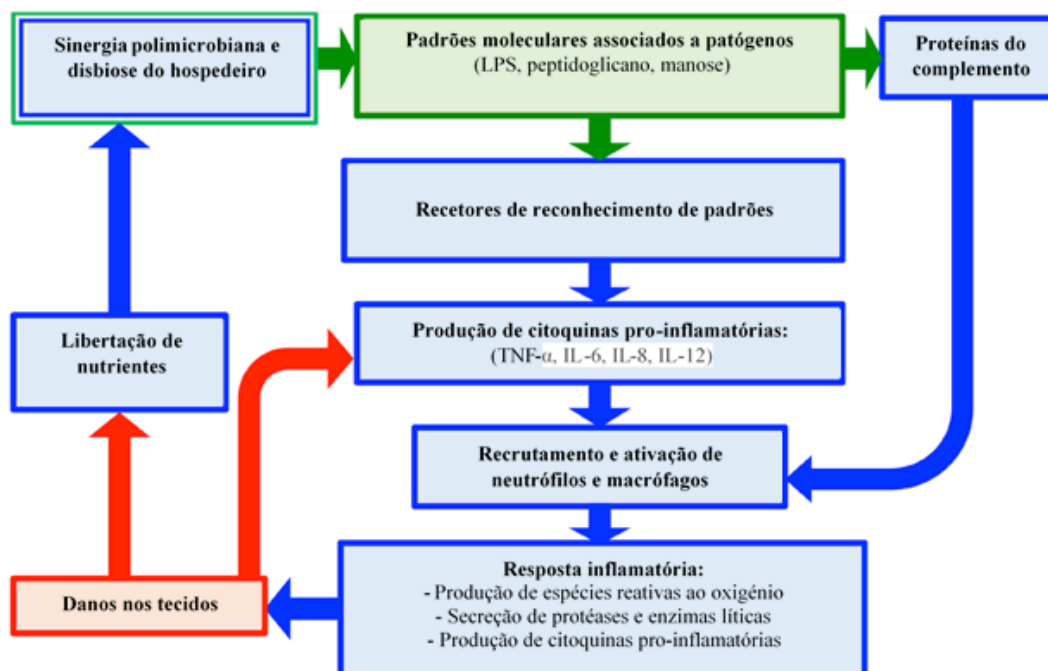
não requer um processo de ativação específico, sendo libertada por células danificadas ou em apoptose. Já a IL-1 $\beta$  requer uma ativação proteolítica e é produzida por monócitos e macrófagos, sendo a sua ativação altamente regulada (Jesus e Goldbach-mansky, 2015). Os péptidos antimicrobianos (AMPs) secretados pela mucosa oral do hospedeiro também irão atuar no controlo da colonização microbiana e limitar a sua propagação. Uma vez que os PMNs e os macrófagos têm uma rápida resposta a lesões do tecido epitelial, quando ocorre o rompimento da barreira mucosa (devido ao ambiente inflamatório causado pela disbiose), dá-se um evento altamente imunogénico, sendo que a disbiose e a inflamação se reforçam positivamente entre si num ciclo patogénico (Figura 6) (Khan et al., 2015; Hajishengallis, 2014).



**Figura 6** – Periodontite induzida no hospedeiro suscetível pela comunidade microbiana [adaptado de (Hajishengallis, 2014)].

A saúde periodontal requer um estado imuno inflamatório controlado, que possa manter a homeostase entre hospedeiro e microrganismos no periodonto. Contudo, na periodontite a resposta imune do hospedeiro está desregulada, sendo por isso ineficaz no controlo do crescimento bacteriano. Sendo estas reações inflamatórias localizadas no tecido, vão resultar em danos tais como a periodontite em que as lesões iniciais desencadeiam o recrutamento de PMNs para as áreas danificadas. Para auxiliar na eliminação dos patógenos, a desgranulação dos PMNs vai resultar na libertação de proteases, o que também vai provocar danos locais adicionais no tecido do hospedeiro. Para além das enzimas, também a ativação dos PMNs vai resultar na produção de citocinas pro inflamatórias, como a interleucina IL-1, mais uma vez, e o fator de necrose

tumoral (TNF $\alpha$ ) o que contribui para o aumento da inflamação. Apesar de em infecções nas restantes localizações do corpo o envolvimento do sistema imune ser habitualmente suficiente, na cavidade oral a presença constante da organização bacteriana do biofilme previne a resposta imune de eliminar a infeção, permitindo que a inflamação persista e cause danos nos tecidos. Assim, apesar do estímulo inicial da inflamação da gengiva ser microbiano, os danos nos tecidos do hospedeiro são extensamente mediados pela resposta imune (Figura 7) (Khan et al., 2015; Hajishengallis, 2014).



**Figura 7** – Esquema das patologias associadas á interação entre microrganismos e hospedeiro na doença periodontal [adaptado de (Khan et al., 2015)].

Qual o papel da genética do hospedeiro na patogénese da doença periodontal?

Vandenbroeck e Goris (2003) descobriram que polimorfismos nos genes IL4 podiam influenciar a expressão fenotípica de certas doenças multifatoriais e o risco de contrair estas doenças.

A interleucina-4 (IL4) é um importante regulador da função dos macrófagos, e inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias (como IL1, IL6 ou TNF $\alpha$ ) após a estimulação com o LPS das bactérias periodontopatogénicas. A falta de IL4 nos tecidos

periodontais pode causar acumulação de macrófagos, que pode levar à reabsorção óssea irreversível (Finoti et al., 2013).

Finoti et al. (2013) desenvolveram um estudo em que o principal objetivo seria avaliar se sujeitos com diferentes haplótipos para a IL4 seriam colonizados de forma diferente pelos patógenos periodontais, e se responderiam de formas diferentes à terapia periodontal não cirúrgica. Foram analisados 39 sujeitos com o haplótipo IL4 da suscetibilidade genética à doença periodontal (IL4+) ou proteção contra a periodontite (IL4-) e foram divididos em 4 grupos: com periodontite: IL4+ (TCI/CCI) – 6 pacientes; IL4- (TTD/CTI) – 9 pacientes; sem periodontite: IL4+ (TCI/CCI) – 12 indivíduos; IL4- (TTD/CTI) – 12 indivíduos. Os níveis de periodontopatógenos (*P. gingivalis*, *T. denticola*, e *T. forsythia*) foram analisados por PCR quantitativo (qPCR) e os níveis de microrganismos foram expressos como o número de cópias do gene 16S rRNA.

**Tabela 1** – Contagem de cópias do gene 16S rRNA dos microrganismos em questão, em amostras de doença, saudáveis e de controle (no início, e 45 e 90 dias depois do tratamento) IL4+ - indivíduos com haplótipo TCI/CCI IL4; IL4 - - indivíduos com haplótipo TTD/CTI IL 4 [adaptado de (Finoti et al., 2013)].

Counts of 16S rRNA	Groups		p-Value*
	IL4+	IL4-	
<b>Diseased sites</b>			
<i>P. gingivalis</i>			
Baseline	<u>1,240.5</u> (2.2–18,810.2)	<u>35.5</u> (1.0–5,884.5)	0.0397
45 days	2.8 (0.0–7.4) <sup>#</sup>	2.6 (0.0–28.4) <sup>#</sup>	NS
90 days	0.5 (0.0–10.0) <sup>#</sup>	1.6 (0.0–14.0) <sup>#</sup>	NS
p-Value**	0.0002	<0.0001	
<i>T. denticola</i>			
Baseline	<u>6,555.8</u> (3.4–182,635.6)	<u>129.4</u> (3.0–20,054.9)	0.0227
45 days	84.1 (0.7–13,332.7) <sup>#</sup>	41.0 (0.0–18,784.6) <sup>#</sup>	NS
90 days	12.9 (0.0–597.6) <sup>#</sup>	0.4 (0.0–292.8) <sup>#</sup>	0.0199
p-Value**	<0.0001	<0.0001	
<i>T. forsythia</i>			
Baseline	<u>1,449.8</u> (6.0–10,793.7)	<u>16.8</u> (1.6–8,837.7)	0.0257
45 days	21.5 (2.3–5,402.9) <sup>#</sup>	5.2 (0.9–2,899.0) <sup>#</sup>	NS
90 days	5.1 (0.0–16.0) <sup>#</sup>	3.4 (1.4–12.2) <sup>#</sup>	NS
p-Value**	<0.0001	<0.0015	
<b>Healthy sites</b>			
<i>P. gingivalis</i>			
Baseline	<u>8.5</u> (0.0–12.2)	<u>1.8</u> (0.0–9.9)	0.0087
45 days	0.4 (0.0–7.2) <sup>#</sup>	0.9 (0.0–8.5) <sup>#</sup>	NS
90 days	0.0 (0.0–6.7) <sup>#</sup>	0.0 (0.0–4.4) <sup>#</sup>	NS
p-Value**	0.0015	0.0018	NS
<i>T. denticola</i>			
Baseline	<u>31.4</u> (0.0–117.2)	<u>9.4</u> (0.0–119.2)	NS
45 days	13.3 (0.0–40.2) <sup>#</sup>	4.1 (0.0–47.1) <sup>#</sup>	NS
90 days	1.1 (0.0–36.8) <sup>#</sup>	0.0 (0.0–24.8) <sup>#</sup>	NS
p-Value**	0.0183	0.0015	
<i>T. forsythia</i>			
Baseline	<u>6.0</u> (0.9–26.5)	<u>2.4</u> (0.0–295.1)	0.0472
45 days	1.9 (0.0–19.7) <sup>#</sup>	2.1 (0.0–59.5)	NS
90 days	1.8 (0.0–14.4) <sup>#</sup>	0.0 (0.0–2.9) <sup>#</sup>	0.0158
p-Value**	0.0052	0.0029	
<b>Control sites</b>			
<i>P. gingivalis</i>			
Baseline	<u>3.4</u> (0.28–34.7)	<u>3.6</u> (0.0–13.8)	NS
45 days	3.0 (0.0–17.5)	1.9 (0.0–16.7)	NS
90 days	1.7 (0.0–12.8) <sup>#</sup>	1.4 (0.0–7.1) <sup>#</sup>	NS
p-Value**	0.0011	0.0063	
<i>T. denticola</i>			
Baseline	<u>2.8</u> (0.0–464.5)	<u>4.0</u> (0.0–121.3)	NS
45 days	2.9 (0.0–365.4)	2.4 (0.0–111.8)	NS
90 days	0.8 (0.0–61.2)	0.9 (0.0–14.6)	NS
p-Value**	NS	NS	
<i>T. forsythia</i>			
Baseline	2.1 (0.0–5.9)	4.0 (0.0–121.3)	NS
45 days	2.4 (0.0–3,568.2)	2.4 (0.0–111.8)	NS
90 days	0.5 (0.0–26.6)	0.9 (0.0–14.6)	NS
p-Value**	NS	NS	

Como se pode observar na Tabela 1, caso o sujeito fosse saudável ou doente à partida, indivíduos com o haplótipo TCI/CCI IL4 (IL4+) possuíam os patógenos do estudo em maior número do que os portadores do haplótipo TTD/CTI IL4 (IL4-), o que

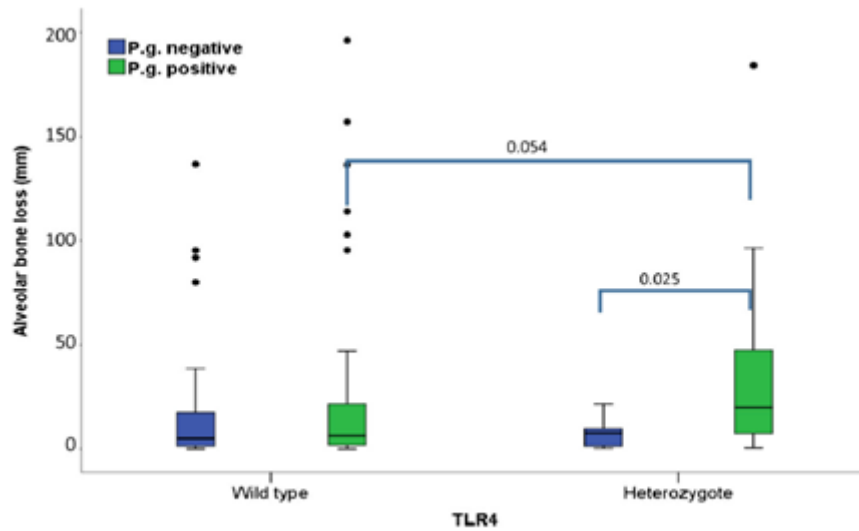
contribui sinergicamente para o desenvolvimento da periodontite crônica. No entanto, os tratamentos não cirúrgicos realizados (que incluíram curetagem radicular manual num período de 3 a 4 semanas, e destartarização ultrassônica) foram igualmente eficazes independentemente de haver ou não esta modificação na IL4, indicando que a terapia periodontal não depende do haplótipo em causa (Finoti et al., 2013).

Kornman et al. (1997) verificaram que apesar da placa bacteriana, algumas bactérias e a idade estarem associadas à periodontite, não havia preditores específicos que determinassem a suscetibilidade à doença. Tendo em conta que a IL-1 é um regulador essencial na resposta do hospedeiro à infecção microbiana, verificaram que um polimorfismo nesta citocina estava associado com a severidade da periodontite em não fumadores.

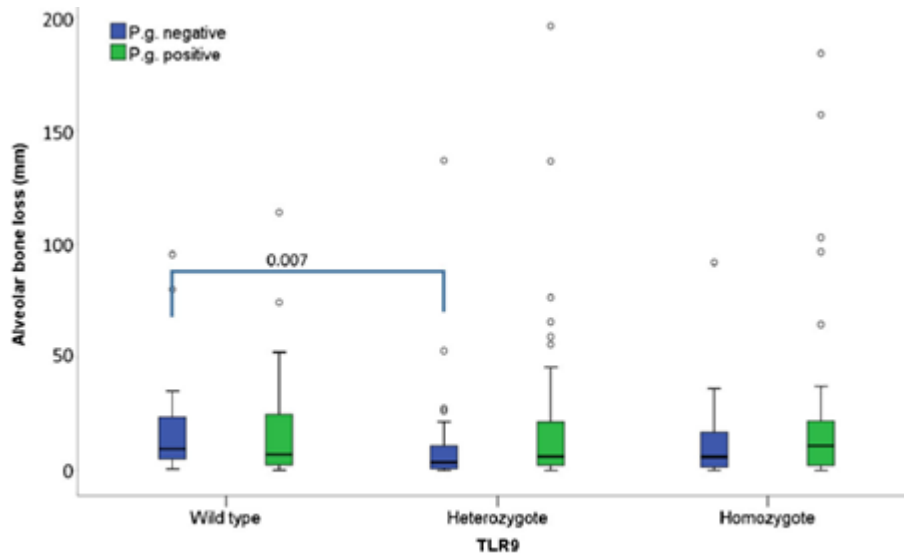
No que respeita às variantes da IL-1, o polimorfismo de um único nucleótido (SNP) pode modular a capacidade da citocina, que como já se referiu, atua na patogénese da periodontite, sendo capaz de afetar a suscetibilidade e severidade à mesma. O estudo realizado por Cantore et al. (2014) pretendeu testar se um polimorfismo na região do promotor da IL-1 poderia modular a função desta citocina, dado o papel da mesma na regulação imune e nos processos inflamatórios através da indução da expressão de várias proteínas efetoras (como as MMPs). Os genes  $IL-1\alpha^{+4845}$  e  $IL-1\beta^{+4954}$ , duas moléculas funcionalmente similares à IL-1, encontram-se localizadas no braço longo do cromossoma 2 (região 2q13-14), e foram analisadas num grupo de 195 indivíduos (dos quais 99 tinham doença periodontal). As amostras de sangue recolhido foram amplificadas usando primers de PCR da  $IL-1\alpha^{+4845}$  e  $IL-1\beta^{+4954}$  no termociclador. As espécies microbianas foram determinadas a partir da placa bacteriana usando a técnica de PCR e quantificada a quantidade de bactérias presentes de cada espécie [*Fusobacterium nucleatum* (27%), *Camapyllobacter rectus* (20%), *Eikenella corrodens* (20%), *Tannerella forsythia* (2%), *Treponema denticola* (6%), *Parvimonas micra* (7%), *Porphyromonas gingivalis* (10%), e *Prevotella intermedia* (8%)]. Após determinada a frequência dos polimorfismos observados nos dois genes, nomeadamente  $IL-1\alpha^{+4845}$  e  $IL-1\beta^{+4954}$ , verificou-se uma diferença significativa entre os grupos de estudo, sendo que foi observada uma considerável correlação entre a forma severa de periodontite (sangramento à sondagem e perda de inserção superior a 6mm) e a presença deste genótipo ( $IL-1\alpha$  e  $IL-1\beta$ ) pelo que os indivíduos portadores deste polimorfismo estão mais sujeitos a desenvolver a doença periodontal.

A *Porphyromonas gingivalis* é uma das principais bactérias periodontopatogênicas, promovendo a disbiose do biofilme oral através da regulação da composição do mesmo em termos qualitativos e quantitativos. Esta vai desencadear três eventos: subversão da secreção de IL-8 (quimiocina envolvida na migração dos neutrófilos); subversão da atividade do sistema de complemento (por proteólise dos seus constituintes); e ativação do TLR4 (Lemos, 2016). Vários fatores de virulência deste periodontopatógeno podem ativar ou inibir a resposta imune do hospedeiro. No entanto, quando o LPS da membrana das bactérias é detetado pelo TLR4 não significa que as mesmas sejam eliminadas e a doença seja suprimida. Como já foi referido, os PRRs têm um papel importante na resposta imune do hospedeiro, sendo os TLRs um dos PRRs mais estudados. Até à data foram caracterizados em humanos 10 TLRs (TLR 1-10). As células do ligamento periodontal e dos tecidos gengivais reconhecem o LPS das bactérias através do TLR4 (Gursoy, He, Pussinen, Huumonen e Könönen, 2016). Em estudos realizados em ratos foi observado que perturbações na função do TLR4 e TLR9 podiam causar uma resposta imune contra *P. gingivalis* deficiente, o que leva a uma resposta inflamatória debilitada e eventualmente perda óssea alveolar (Costalonga, Batas, e Reich, 2009; Kim et al., 2015).

Gursoy et al. (2016) pretenderam saber se um indivíduo que possua esta bactéria e polimorfismos nos TLR4 (rs4986790) e TLR9 (rs187084), localizados nos promotores, estão em risco de desenvolver perda óssea alveolar. Fizeram um estudo em que recolheram saliva de 223 sujeitos com perda óssea alveolar, e a genotipagem dos polimorfismos nestes genes foi feita através de pirosequenciação das amostras de saliva, enquanto que os níveis da bactéria foram analisados por PCR. Ao determinar a associação destes três fatores (TL4, TLR9 e *Porphyromonas gingivalis*), verificou-se que os sujeitos com o polimorfismo rs4986790 no TLR4 (heterozigóticos) e que eram portadores de *Porphyromonas gingivalis* desenvolviam uma avançada perda de osso alveolar (Figura 8). Por sua vez, no caso de polimorfismo rs187084 no TLR9, este pode ser protetor contra a perda óssea, desde que a bactéria esteja ausente, já que os indivíduos heterozigóticos tiveram menos perda óssea do que os que possuíam o wild-type (a perda óssea foi medida através de radiografias panorâmicas, em mm) (Figura 9).



**Figura 8** – Perda óssea alveolar em sujeitos que possuem o wild type e genótipo heterozigótico TL4 de acordo com a presença de *P. gingivalis*. As diferenças significativas entre os grupos estão marcadas com o valor de *p* [adaptado de (Gursoy et al., 2016)].



**Figura 9** – perda óssea alveolar em sujeitos que possuem o wild type e genótipo heterozigótico e homozigótico TL9 de acordo com a presença de *P. gingivalis*. As diferenças significativas entre os grupos estão marcadas com o valor de *p* [adaptado de (Gursoy et al., 2016)].

Uma vez que a periodontite é uma doença multifatorial e o biofilme é responsável pela infecção periodontal, um único polimorfismo e a presença de um patógeno não pode explicar completamente o desenvolvimento da periodontite. Ainda assim, e para definição de grupos de risco, importa reter que se os indivíduos possuírem *Porphyromonas gingivalis* e tiverem polimorfismos funcionais no TLR4 estão sujeitos a perda óssea, enquanto polimorfismos no TLR9 podem ser protetores da mesma, desde que na ausência desta bactéria.

## 7.2. Suscetibilidade genética a infecções endodônticas

A infecção endodôntica primária (caso da periodontite apical) é caracteristicamente poli microbiana, sendo causada essencialmente por bactérias anaeróbias estritas, mas também por uma pequena porção de anaeróbias facultativas (Vidana, Sullivan, Billstrom, Ahlquist, e Lund, 2011). Esta infecção desenvolve-se após a necrose pulpar, sendo considerada uma seqüela da lesão de cárie, trauma, ou doença periodontal. Para que a infecção primária ocorra os fatores necessários são: potencial redox, disponibilidade nutricional e pH intra-canal (Teixeira, 2015). As bactérias anaeróbias estritas são relativamente fáceis de eliminar através da correta instrumentação e irrigação dos canais dentários, no entanto, por vezes as anaeróbias facultativas conseguem sobreviver a estes procedimentos, conquistando conseqüentemente este nicho ecológico. Isto porque o canal dentário tem uma natureza e anatomia complexas, sendo quase impossível fazer uma limpeza e desinfecção por absoluto, e inevitavelmente é deixada matéria orgânica e inorgânica residual. Quer seja por infiltração coronária, quer por restos depois do tratamento, os microrganismos podem invadir o sistema de canais radiculares, tendo como substrato remanescentes de tecido pulpar ou exsudado periapical. Assim sendo, a infecção persistente de dentes endodonticamente tratados (infecção endodôntica secundária) é causada tipicamente por bactérias anaeróbias facultativas, sendo a *Enterococcus faecalis* uma das espécies mais frequentes (Vidana, Sullivan, Billstrom, Ahlquist, e Lund, 2011).

O tratamento endodôntico tem como objetivo a cura completa da patologia periapical, bem como a restauração da função. A periodontite periapical consiste numa doença inflamatória que afeta os tecidos envolventes da ponta da raiz do dente, e que engloba uma ligação dinâmica entre fatores microbianos e as defesas do hospedeiro. Tendo em conta a sua etiologia multifatorial, representa uma interação entre agentes microbianos e a resposta imune do hospedeiro, a qual resulta na produção de citocinas que em último caso dará lugar a uma reabsorção óssea (Morsani, Aminoshariae, Han, Montagnese, e Mickel, 2011; Siqueira e Rôças, 2013).

Apesar dos fatores microbianos estarem sempre implicados, fatores relacionados com o hospedeiro podem influenciar a severidade das lesões periapicais. Temos como exemplo fatores relacionados com a saúde, nomeadamente condições sistémicas (diabetes, infecções com herpes vírus, stress, doenças auto-imunes, doenças que afetam a

resposta imunitária) mas também fatores genéticos, como polimorfismos (Siqueira e Rôças, 2013).

No estudo de Morsani, Aminoshariae, Han, Montagnese e Mickel (2011) colocou-se a hipótese de um polimorfismo no gene que codifica para a IL-1 $\beta$  estar associado a um risco aumentado de periodontite apical persistente. Os efeitos locais da IL-1 incluem: aumento da adesão dos leucócitos às paredes endoteliais, estimulação dos linfócitos, potencialização dos neutrófilos, produção de prostaglandinas e enzimas proteolíticas, reabsorção óssea aumentada e inibição da formação óssea, características na sua maior parte já referidas. A IL-1 $\beta$  é a forma predominante da interleucina presente nas lesões periapicais nos humanos. É sabido que as bactérias são necessárias para iniciar a resposta inflamatória do paciente, mas tal como foi referido, outros fatores podem modular ou amplificar a resposta inflamatória mudando a apresentação clínica e progressão da doença. No âmbito desta perspetiva genética aplicada à endodontia, investigou-se se variantes específicas no gene pro inflamatório da IL-1 $\beta$  (neste caso o alelo 2), contribuem para uma resposta individual da predisposição para periodontite periapical. Foram selecionados 34 sujeitos que apresentavam periodontite persistente, e 61 sujeitos com tratamento endodôntico realizado há pelo menos um ano sem presença de sinais nem sintomas foram selecionados como controlo. Para recolha da amostra de DNA recolheu-se uma amostra de saliva da bochecha, e o DNA genómico foi recolhido (Puregene DNA Purification Kit) e realizada a sua genotipagem.

**Tabela 2** – Distribuição do polimorfismo IL1 $\beta$  [adaptado de (Morsani et al., 2011)].

	Odds ratio (adjusted)	95% Confidence interval	P value
Age/Years	1.0	0.95-1.0	.99
Sex			
Male	1.0		
Female	0.62	0.2-1.9	.42
Medical condition			
None	1.0		
Any	0.93	0.28-3.1	.90
Genotype			
Wild type	1.0		
Any polyallele	<b>7.6</b>	2.4-23.7	<.001

Os resultados demonstram uma diferença significativa na distribuição do genótipo polimórfico, definido como a presença de pelo menos um alelo 2 do IL-1 $\beta$  (que inclui

todos os heterozigóticos e homozigóticos para o alelo), estando presente em 70,6% dos indivíduos com periodontite apical e 24,6% nos controlos. Os sujeitos com pelo menos um alelo polimórfico tinham 7 vezes mais probabilidade de desenvolver periodontite apical do que aqueles sem polimorfismo (Tabela 2). Como implicações clínicas, seria possível analisar os candidatos à endodontia para a presença do genótipo IL-1 $\beta$ , e assim alertar os pacientes da sua predisposição para a possível ocorrência de periodontite apical (Morsani et al., 2011).

A periodontite apical pode assumir, clinicamente, uma fase aguda (supurativa) e uma fase crónica (não supurativa). A IL-8 é uma das citocinas envolvidas no desenvolvimento da periodontite apical. Por exemplo, a IL-8/CXL8, a quimiocina mais potente conhecida, medeia a ativação e migração de neutrófilos para o tecido em redor da raiz do dente a partir do sangue periférico. Pode ser produzida no início da resposta inflamatória e persistir por um período de tempo prolongado (dias ou mesmo semanas). O objetivo do estudo de Amaya et al. (2013) foi investigar se os polimorfismos genéticos nos genes inflamatórios IL1B, IL8/CXL8, IL12B e TNFA poderiam estar associados à periodontite aguda soporativa ou crónica não supurativa. Este estudo incluiu 120 sujeitos que foram diagnosticados com periodontite apical, que foram divididos em 2 grupos: 63 com infeção aguda (ASAP) e 57 crónica (CNAP) para controlo. O DNA genómico foi isolado das amostras de sangue recolhidas, e a genotipagem dos genes em estudo foi realizada pelo método de PCR e análise de fragmentos de restrição obtidos com enzimas de restrição. A observação do resultado foi realizada por eletroforese em gel de agarose.

**Tabela 3** – Frequência do genótipo IL-8 em indivíduos com ASAP e CNAP [adaptado de (Amaya et al., 2013)].

SNPs	Frequência do genótipo		P	OR (95% CI)
	ASAP N = 63 (%)	CNAP N = 57 (%)		
<i>IL8/CXCL8</i>				
-251				
TT	28 (44.4)	15 (26.3)	0.039 <sup>a</sup>	2.22 (1.04-4.84)
TA	29 (46)	32 (56.1)	NS	
AA	6 (9.5)	10 (17.5)	NS	
T	85 (67.5)	62 (54.4)	NS	
A	41 (32.5)	52 (45.6)	0.038 <sup>b</sup>	0.57 (0.34-0.97)

Os resultados indicaram que o polimorfismo IL8/CXCL8 -251 está associado a duas características da periodontite apical: o alelo A está associado ao desenvolvimento

de CNAP, e o genótipo TT (e, portanto, o alelo T) está associado ao desenvolvimento de ASAP. Este polimorfismo (IL8/CXCL8 -251) tem sido associado a variações na expressão génica, sendo que uma maior supra regulação desta quimiocina em pacientes com ASAP levaria à ativação monócitos/macrófagos e neutrófilos, resultando em agressões contra a polpa dentária. Assim, os indivíduos que possuem os alelos T e A do IL8/CXCL8 -251, podem contribuir, respetivamente, para o desenvolvimento da periodontite apical supurativa aguda e não supurativa crónica, sendo que os portadores do alelo T produzem maiores quantidades de IL8/CXCL8 -251 do que os portadores do alelo A (Amaya et al., 2013).

### 7.3. Suscetibilidade genética à cárie

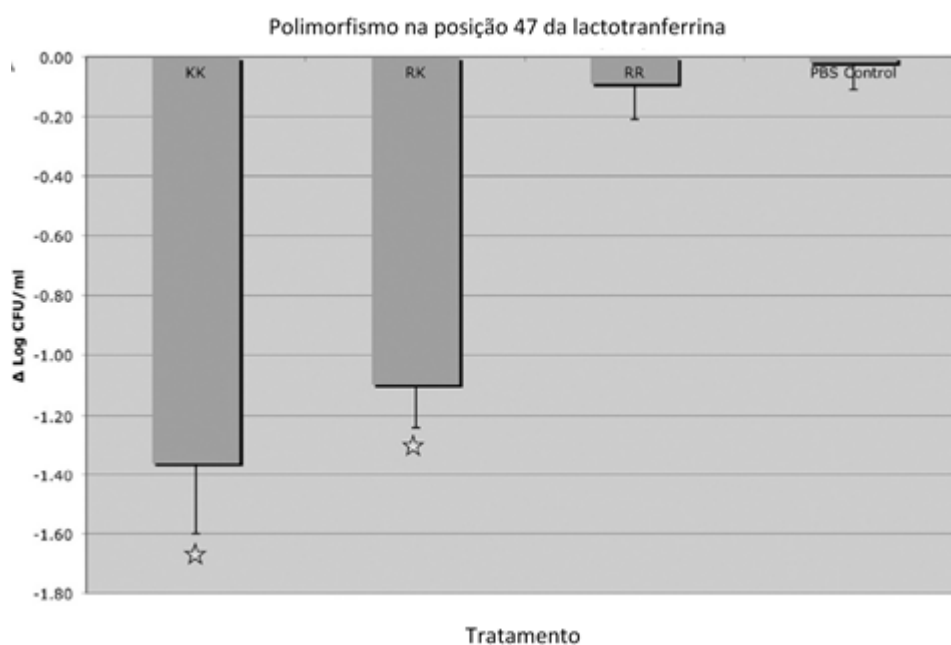
A cárie dentária consiste numa doença crónica infecciosa, que resulta da adesão ao dente de determinadas bactérias gram positivas, principalmente o *Streptococcus mutans*, que vão metabolizar açúcares produzindo como resultado ácido láctico que vai desmineralizar a estrutura dentária. É considerada uma infeção pandémica bastante comum, sendo que afeta aproximadamente 70% da população (Fine et al., 2013; Moslemi et al., 2015). Estas bactérias produtoras de ácido encontram-se no biofilme e vão começar por provocar uma lesão na superfície do esmalte. Se não houver nenhuma intervenção no sentido de parar a progressão da desmineralização, esta estender-se-á até à dentina, vai provocar cavitação, infeção da dentina desmineralizada, dissolução da matriz dentinária e, em último caso, necrose pulpar (Hilton, Ferracane, e Broome, 2013).

A saliva, graças ao seu contacto íntimo com a mucosa oral e as estruturas dentárias, tem uma importante influência nas doenças da cavidade oral (incluindo a cárie), bem como a capacidade de afetar ambas as respostas do hospedeiro e dos microrganismos presentes. Através das suas características físico químicas, a saliva tem um papel preponderante na prevenção de cáries. Características que consistem na sua capacidade tampão, o pH, lavagem/limpeza da cavidade oral, a taxa de fluxo, reparação de tecidos e ação antimicrobiana. Assim, qualquer perturbação que exista nestes fatores pode ser considerada um fator de risco para o aparecimento de cáries (Fine et al., 2013; Moslemi et al., 2015).

A lactotransferrina é uma glicoproteína salivar, e tem um importante papel na atividade antibacteriana contra *S. mutans*, uma das principais bactérias no início da lesão de cárie. Esta proteína liga-se ao ferro, diminuindo assim a sua quantidade disponível para o metabolismo bacteriano, funcionando como um agente bacteriostático (Doetzer et al., 2015).

Há vários anos Fine et al. (2013) identificaram um polimorfismo num nucleótido (SNP) no gene LTF de um indivíduo que tinha periodontite agressiva mas nenhuma cárie proximal. Este polimorfismo (SNP) produzia uma mudança de arginina (R) para lisina (K) na posição 47 do aminoácido que se encontrava na região antimicrobiana da proteína LTF. Como resultado, os autores criaram duas proteínas recombinantes LTF diferentes, expressas num vetor e testadas contra *S. mutans*. A variante com lisina tinha uma

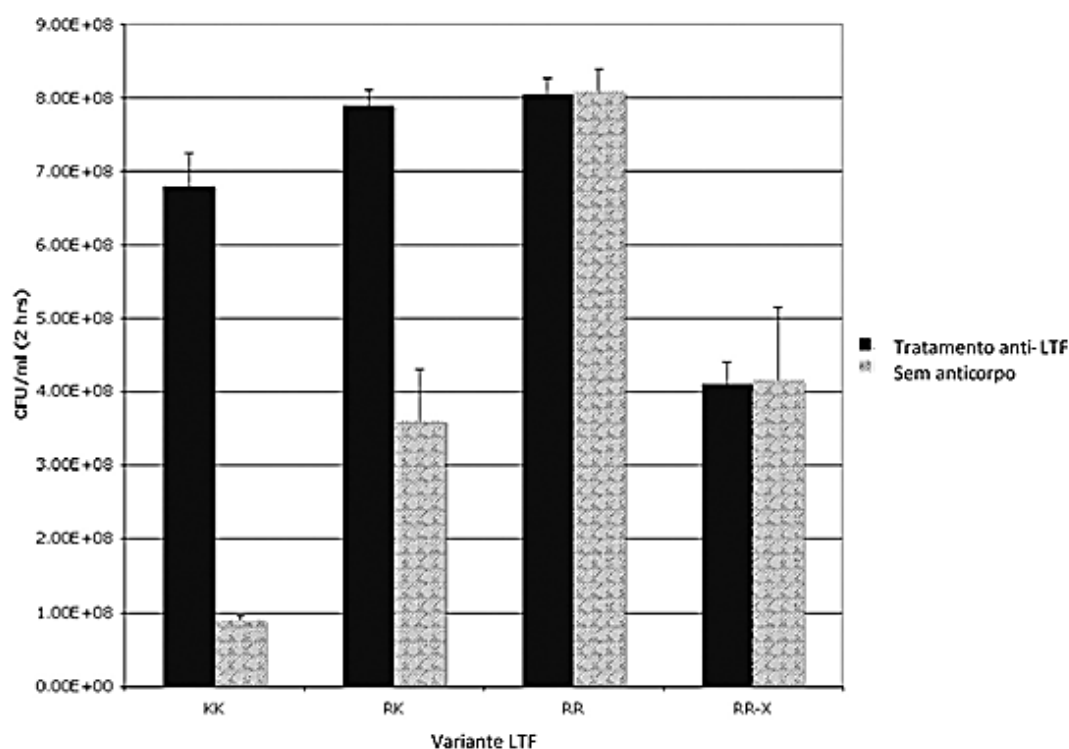
atividade antimicrobiana contra *S. mutans*, enquanto que a variante “original” com arginina não apresentava essa atividade. No entanto, faltava comprovar a atividade dessa proteína recombinante na saliva *in vivo*. Um grupo de 30 indivíduos selecionado por ter poucas cáries foi genotipado para LTF/K e LTF/R, dos quais 8 eram homozigóticos para KK, 10 homozigóticos para RR e 12 heterozigóticos. Para determinar se a atividade antimicrobiana na saliva se devia à LTF, a saliva foi pré tratada com anticorpo para LTF, sendo este diluído na mesma. Avaliando a saliva dos sujeitos homozigóticos para a variante da lisina (uma vez que já tinha sido demonstrado que a variante lisina produzida num vetor tinha matava *S. mutans*), observou-se que a saliva dos sujeitos KK reduziu o crescimento de *S. mutans* comparativamente com a saliva RR. Os indivíduos RK demonstraram intermédia atividade antimicrobiana (Figura 10).



**Figura 10** – Atividade antimicrobiana da saliva de sujeitos com genótipos LTF. A barra mais à esquerda mostra a atividade anti *S. mutans* da saliva de sujeitos homozigóticos para a lisina (KK); a barra seguinte mostra os sujeitos heterozigóticos (RK) e a barra seguinte os sujeitos homozigóticos para a arginina (RR). Os KK demonstraram uma redução de 1,3 log na sobrevivência de *S. mutans*. Os heterozigóticos uma redução de 1,1 log e os RR não mostraram qualquer redução [adaptado de (Fine et al., 2013)].

Comparando as cáries entre os 30 sujeitos, no grupo KK diagnosticaram-se 4 lesões de cárie, no grupo RK 15 lesões de cárie e no grupo RR observou-se um total de 35 cáries (RR > RK > KK), o que corrobora com o pressuposto deste estudo. Para

determinar se a atividade vista na saliva se devia realmente à LTF, a saliva foi pré tratada com anticorpo para LTF. Verificou-se uma redução de atividade produzida pelo anticorpo LTF significativa nos sujeitos RK e KK, sendo que nos sujeitos RR não se verificaram alterações. Dois dos sujeitos RR mostraram alguma atividade anti *S. mutans* (RR-X); no entanto, o pré-tratamento da saliva não mostrou nenhuma redução na atividade antimicrobiana, sugerindo que a atividade antimicrobiana nestes sujeitos provem de outra fonte que não a LTF (Figura 11). Estes dados indicam que a saliva de 18 sujeitos homozigóticos (8 KK e 10 RR) expressou o padrão de atividade antimicrobiana esperado (que o pré-tratamento com anticorpo do LTF vai reduzir a atividade antimicrobiana anti *S. mutans* na saliva K mas não vai ter impacto na saliva R) sendo que fatores externos não interferem com a atividade anti microbiana observada.



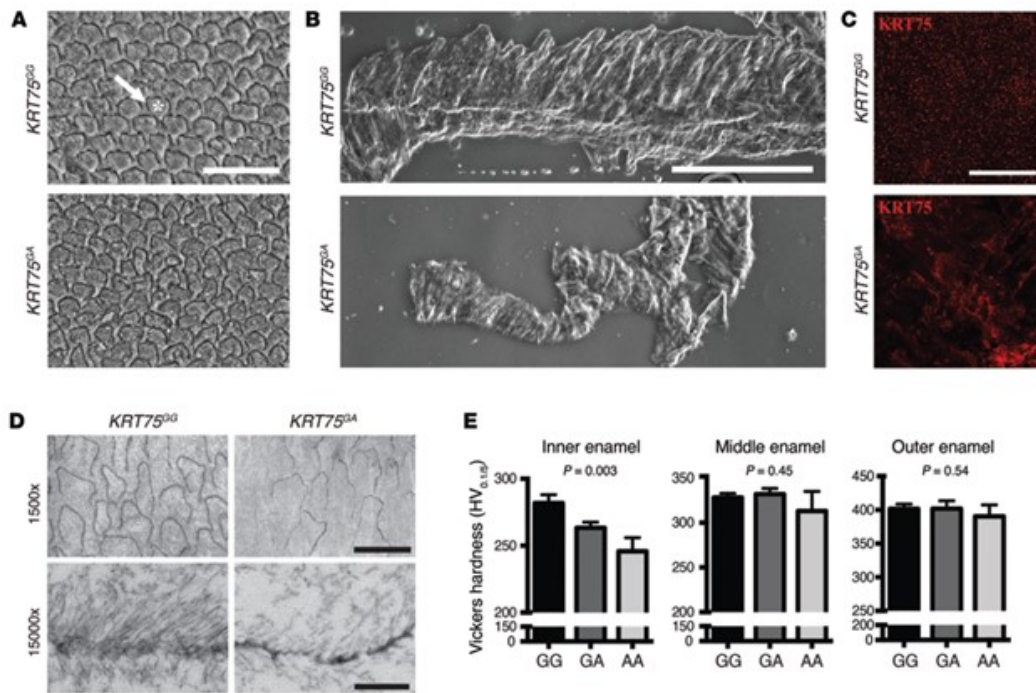
**Figura 11** – Atividade anti *S. mutans* na saliva dos sujeitos com genótipos KK, RK e RR, e o efeito do pré-tratamento desta saliva com anticorpos para LTF. Pode observar-se a atividade anti *S. mutans* dos indivíduos dos 3 genótipos e o efeito que o pré-tratamento com o anticorpo teve. A barra da esquerda do KK mostra o crescimento de *S. mutans* apos o tratamento com anticorpo, enquanto que a da direita uma significativa redução no crescimento de *S. mutans* na saliva não tratada. 2 dos 10 sujeitos RR mostraram alguma atividade antimicrobiana, não sendo afetados pelo pré-tratamento da saliva. As barras RK também mostram uma significativa redução na atividade antimicrobiana quando a saliva foi pré tratada [adaptado de (Fine et al., 2013)].

O estudo destes autores é único, no sentido em que demonstra o isolamento, a identificação definitiva e a caracterização da proteína LTF como uma glicoproteína

salivar específica com atividade antimicrobiana contra *S. mutans*. Os dados mostram também que a variante lisina da LTF em saliva de indivíduos homocigóticos para esta variante de lisina, apresenta atividade contra *S. mutans*. Em contraste, indivíduos homocigóticos para a variante de arginina da LTF apresentam atividade mínima anti *S. mutans*. Por selecionar uma população específica com muito poucas cáries, aumentaram-se as probabilidades de selecionar um indivíduo que tivesse uma proteína que manifestasse uma elevada atividade antimicrobiana contra microrganismos cariogênicos (tendo por base estudos anteriores).

Para além de fatores como o tipo de dieta e a higiene oral, o desenvolvimento da cárie também está dependente da estrutura do esmalte. O esmalte proporciona forma e dureza ao dente e consiste em 96% de matéria inorgânica, 1% matéria orgânica e os restantes 3% de água, sendo que a matéria orgânica se encontra numa camada mais profunda do esmalte. Aqui formam-se os chamados tufos de esmalte, junto à junção amelo-dentinária, que estendem através dos prismas de esmalte, sendo que ambos têm um papel essencial na estabilidade mecânica do esmalte, influenciando a progressão de cáries (Duverger et al., 2014; Hilton, Ferracane, e Broome, 2013).

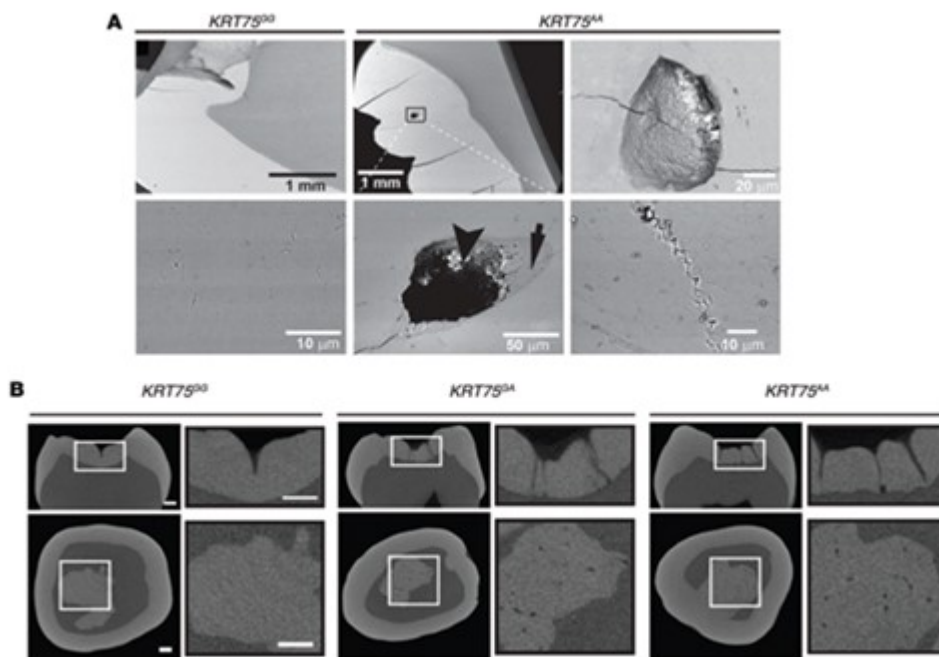
Uma vez que dentes e cabelo têm uma morfogénese semelhante, o esmalte e a queratina contêm o mesmo tipo de material, tendo no entanto estruturas muito diferentes. A transcrição do fator DLX3 controla diretamente a expressão da queratina, durante o desenvolvimento do folículo do cabelo, sendo que várias queratinas epiteliais (como a Kr75) estão transcritas no esmalte. Quando há mutações na queratina, como é o caso da pseudofoliculite (uma doença caracterizada pela formação de pelos encravados na área facial após o barbear) associa-se a um polimorfismo (rs2232387) no gene KRT75, mais prevalente em afro americanos. É uma mutação missense de G para A (KRT75<sup>GG</sup>, KRT75<sup>GA</sup> e KRT75<sup>AA</sup>) que leva a uma substituição da alanina para treonina na posição 161 (A161T) na região do segmento 1A alfa-helicoidal do KRT75. Para determinar se a mutação KRT75<sup>A161T</sup> tinha impacto clínico na função do esmalte, testou-se a associação genética entre o polimorfismo KRT75 (rs2232387) e a cárie num grupo de 706 adultos e 386 crianças, sendo que o alelo missense rs2232387 foi observado em 23% da amostra (através da genotipagem do DNA recolhido de sangue ou saliva) (Duverger et al., 2014).



**Figura 12** – Efeitos do polimorfismo no KRT75 no esmalte. (A) análise através de microscopia eletrônica de varrimento dos molares de pacientes com (KRT75<sup>GA</sup>) e sem (KRT75<sup>GG</sup>) a mutação missense no rs2232387. Asterisco, prisma; Seta, entre os prismas. Escala 20µm. (B) Contraste de interferência diferencial de tufo isolados de molares com o genótipo KRT75<sup>GA</sup> ou KRT75<sup>GG</sup>. Escala 500 µm. (C) detecção da proteína KRT75 nos tufo de esmalte de indivíduos com o genótipo KRT75<sup>GA</sup> ou KRT75<sup>GG</sup>. Escala 20µm. (D) Microscopia eletrônica de transmissão de material orgânico isolado do esmalte (após desmineralização) de indivíduos com o genótipo KRT75<sup>GA</sup> ou KRT75<sup>GG</sup>. Em baixo são imagens de alta resolução dos tufo e prismas de esmalte. Escala 10µm (em cima); 500nm (em baixo). (E) Teste de dureza de Vickers avaliado nos três genótipos (KRT75<sup>GG</sup>, KRT75<sup>GA</sup> e KRT75<sup>AA</sup>). [adaptado de (Duverger et al., 2014)].

De forma a determinar os efeitos deste polimorfismo no esmalte foi feita uma análise estrutural do mesmo através de microscopia eletrônica de varrimento. As amostras revelaram que a distribuição e forma características dos prismas estava alterada em indivíduos portadores da variante do alelo A (Figura 12A). Os tufo e prismas de esmalte de indivíduos com o genótipo KRT75<sup>GA</sup> ou KRT75<sup>AA</sup> aparecerem desorganizados (Figura 12B) e o padrão de distribuição de KRT75 estava também alterado, tendo isto sido confirmado posteriormente por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 12D). Estes resultados implicam que as queratinas epiteliais do cabelo estabilizam os tufo e prismas de esmalte, e que suportam os primas durante a sua formação, que é similar à sua função de suporte no cabelo. Para avaliar as consequências mecânicas destes defeitos do

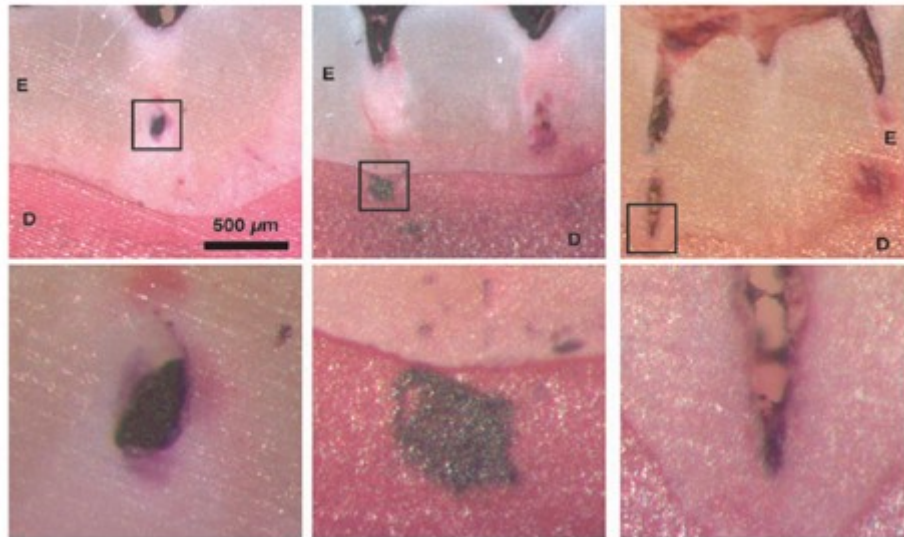
esmalte, fez-se testes de microdureza em molares de seis indivíduos (3 de descendência europeia e 3 afroamericanos) de cada genótipo (KRT75<sup>GG</sup>, KRT75<sup>GA</sup> e KRT75<sup>AA</sup>). A variante missense no KRT75 levou a uma diminuição na dureza de esmalte mais interior, onde o material orgânico é mais abundante. No entanto, ao contrário da pseudofoliculite, o resultado clínico do polimorfismo rs2232387 em termos de defeitos de esmalte e suscetibilidade a cáries não está dependente da raça.



**Figura 13** – Projeções tubulares de fissuras nos molares formando pequenos orifícios na profundidade do esmalte. (A) microscopia eletrônica de varrimento de coroas de molares de indivíduos KRT75<sup>GG</sup> e KRT75<sup>AA</sup>. No KRT75<sup>AA</sup> pode observar-se “cracks” e orifícios rodeados por esmalte parcialmente desmineralizado (seta) contendo partículas semelhantes a bactérias (ponta da seta). (B) Análise micro-CT de molares revelando a presença de pequenos orifícios na superfície do esmalte que se estendem à dentina em pacientes com o alelo A [adaptado de (Duverger et al., 2014)].

Na análise microscópica de varrimento as amostras para microindentação demonstraram a presença de “cracks” e orifícios no esmalte de vários indivíduos com o polimorfismo (Figura 13A). A área em redor dos orifícios estava hipomineralizada, como indica a redução na intensidade (Figura 13A, seta), e a presença de partículas esféricas observadas nestes orifícios sugerem a presença de bactérias (Figura 13A, ponta da seta) o que foi posteriormente confirmado para coloração de Gram (Figura 14). Isto significa que as queratinas epiteliais do cabelo são componentes importantíssimos do esmalte, e

que mutações nestas queratinas aumentam a suscetibilidade à cárie dentária, pois influenciam a estrutura do esmalte (Duverger et al., 2014).



**Figura 14** – Coloração Gram de bactérias nos molares dos indivíduos portadores da mutação rs2232387. O roxo indica bactérias gram positivas nos orifícios presentes no esmalte. E, esmalte; D, dentina [adaptado de (Duverger et al., 2014)].

#### 7.4. Suscetibilidade genética a infecções fúngicas orais

A candidíase oral é considerada uma das infecções fúngicas orais mais frequentes, e a *Candida albicans* é o fungo mais predominante e relevante da cavidade oral (Oncul, Karakis, e Dogruman Al, 2015).

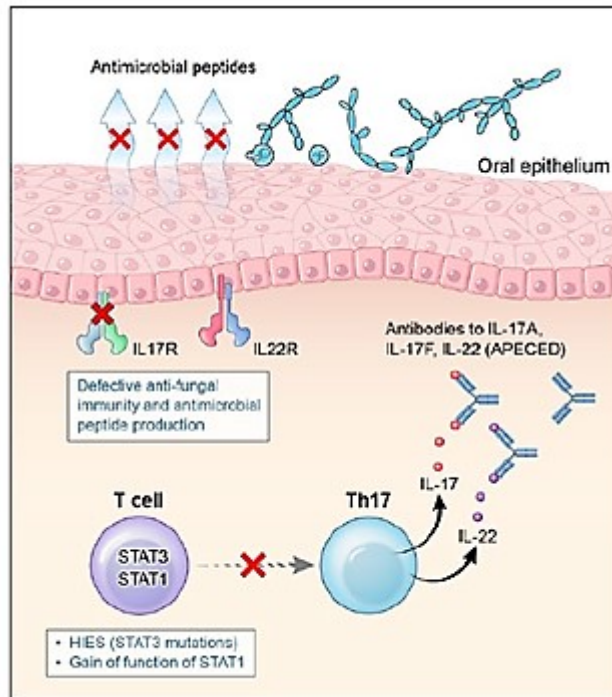
Os indivíduos imunodeprimidos frequentemente desenvolvem candidíase orofaríngea, o que indica que a imunidade local é preponderante para conter a *Candida albicans*. Estudos genéticos em humanos indicam quais os tipos de imunidade necessários para a contenção deste fungo na cavidade oral mantendo um ambiente saudável. A candidíase crônica mucocutânea caracteriza-se por infecções de *Candida* em vários locais do corpo, incluindo a boca, sendo que mutações no gene STAT1 (que codifica para a proteína Transdutora de sinal e ativadora da transcrição 1) tornam os indivíduos suscetíveis a esta doença. O STAT1 é responsável pela sinalização molecular do interferão, IL-17 e IL-22. Mutações nos genes que codificam para IL-17RA e IL-17F têm também sido associadas à candidíase crônica mucocutânea (Underhill e Iliev, 2014).

Há várias imunodeficiências que têm manifestações na cavidade oral, o que nos pode dar uma compreensão geral de elementos chave envolvidos no controlo microbiano e estabilidade da cavidade oral. E é neste sentido que têm surgido estudos de pacientes que possuem alterações na sinalização da IL-17 (fortemente relacionadas com a suscetibilidade das mucosas a fungos), um elemento importante na vigilância da imunidade oral (Moutsopoulos, Lionakis, e Hajishengallis, 2015). Os linfócitos T helper 17 (linfócitos Th17) são essenciais a mediar a imunidade antifúngica através da sua produção de IL-17/IL-22. Em pacientes com deficiência na STAT3<sup>2</sup> e mutações autossômicas recessivas na IL-17RA (recetor A) e autossômicas dominantes na IL-17F, tem-se demonstrado que a sinalização com IL-17 na defesa do hospedeiro contra a candidíase é de extrema importância. Sabendo isto, uma deficiência na capacidade de adesão dos neutrófilos (uma condição rara causado por uma mutação na subunidade CD18 das integrinas  $\beta$ 2) leva a um aumento de produção desregulado de IL-17 (Figura 15). Estes dados indicam que uma desregulação na IL-17 leva a um deficiente

---

<sup>2</sup> A família destes genes (STAT) dão a permissão para a produção de proteínas que fazem parte das vias de sinalização química entre células. As STAT3 estão envolvidas na maturação de células do sistema imune, nomeadamente dos linfócitos T e B [adaptado de <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/STAT3>].

recrutamento de neutrófilos, provocando assim uma inflamação que estimula o crescimento fúngico (Puel et al., 2011).



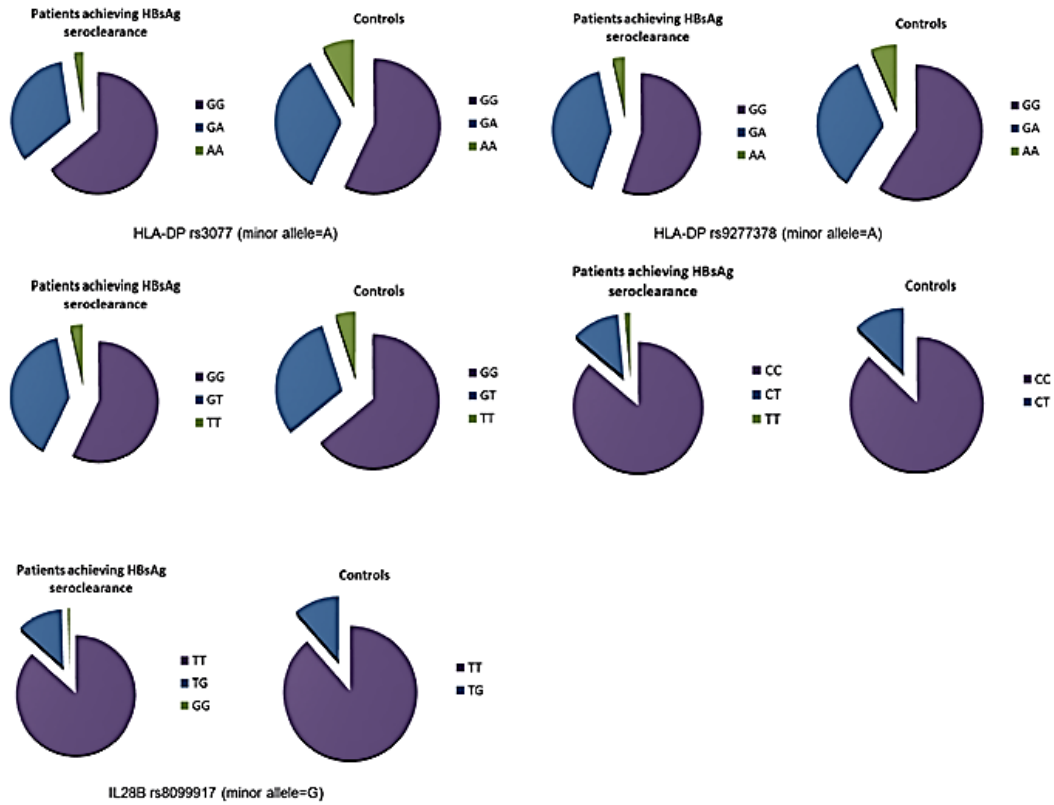
**Figura 15** – Regulação da interleucina 17, essencial à homeostase e imunidade oral. Na esquerda, os defeitos na via IL-17 estão ligados à candidíase oral. A produção defeituosa de linfócitos Th17 em pacientes com mutações STAT3, ganho de função de STAT2 ou sinalização debilitada de IL-17/IL22 estão todos ligados à maior suscetibilidade à candidíase oral. Havendo deficiência da adesão dos neutrófilos, leva a uma desregulação de Th17, causando uma resposta inflamatória exagerada [adaptado de (Moutsopoulos et al., 2015)].

### 7.5. Suscetibilidade genética às infecções orais de etiologia viral

Em relação à presença de vírus na cavidade oral, o mais frequentemente encontrado é o herpes simplex tipo 1 (HSV-1), mas também podem ser encontrados os vírus da hepatite C (HCV), citomegalovírus (CMV) e o vírus do papiloma humano (HPV). (Marsh, Martin, Lewis, e Williams, 2009).

Os marcadores genéticos do hospedeiro podem dar uma indicação da sua capacidade de resistência à progressão da infecção viral, através da capacidade de dar uma resposta imune efetiva. Por exemplo, tendo em conta os polimorfismos nos genes de PRR e nos genes de antígenos de leucócitos humanos (HLA), juntamente com as regiões codificantes do IFN, podem indicar a porção da população que é capaz de criar respostas mais eficazes contra um vírus de RNA, como é o caso do HCV (vírus da hepatite C). (Gale et al., 2014).

A eliminação (“seroclearance”) do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) é um acontecimento pouco frequente na hepatite B crónica (CHB) e tem prognóstico favorável com um baixo risco de carcinoma hepatocelular. Fenótipos de HLA têm sido associados à persistência da infecção com HBV, bem como polimorfismos HLA-DP e polimorfismos IL28B, que se sabe terem influência no resultado da infecção com HCV, incluindo na sua eliminação espontânea e na resposta ao tratamento. A expressão dos genes hepáticos estimulados pelo interferão (ISG) está fortemente associada com polimorfismos IL28B, e podem ter um papel de destaque no controlo imune na infecção com HCV. Este estudo inclui pacientes com CHB e eliminação de HBsAg, para determinar se polimorfismos HLA-DP e polimorfismos IL28B podem influenciar a eliminação do HBsAg na CHB. Foram analisados 203 indivíduos com eliminação espontânea de HBsAg e 203 sem eliminação para controlo. Os polimorfismos HLA-DP localizam-se no cromossoma 6 na região HLA-DPA1 (rs3077) e HLA-DPB1 (rs9277378), e induziu-se um terceiro polimorfismo (rs3128917). O polimorfismo IL28B localiza-se no cromossoma 19 (rs12979860 e rs8099917). Recolheram-se amostras de soro cuja concentração foi medida no espectrofotómetro e extraiu-se o DNA para a sua genotipagem. Os possíveis genótipos são: rs3077 e rs9277378: GG, GA, AA (alelo recessivo - A); rs3128917: GG, GT, TT (alelo recessivo - T); rs12979860: CC, CT, TT (alelo recessivo = T); e rs8099917: TT, TG, GG (alelo recessivo - G) (Figura 16) (Seto et al., 2013).



**Figura 16** – Distribuição genotípica dos 5 polimorfismos [adaptado de (Seto et al., 2013)]

Na análise dos 5 polimorfismos com a eliminação do HBsAg, observou-se que o HLA-DP rs3077 estava associado a esta eliminação, estando o alelo recessivo A associado a uma menor probabilidade de eliminação do HBsAg. Os restantes polimorfismos não mostraram nenhuma associação. No que respeita aos haplótipos, nos relacionados com o HLA-DP, o GAT foi o único que demonstrou estar fortemente associado com a eliminação do HBsAg (Tabela 4); nos haplótipos relacionados com IL28B, o haplótipo CG foi também significativamente associado à eliminação do HBsAg (Seto et al., 2013).

**Tabela 4** – Análise dos 3 polimorfismos dos haplótipos HLA-DP [adaptado de (Seto et al., 2013)].

Haplotype	Frequency (Case/ Controls)	Odds Ratio	95% CI	P Value	rs3077 Controlled PValue
(A)					
GGG	0.622/0.599	1.13	.825–1.48	.503	.268
GAG	0.047/0.040	1.25	.560–2.62	.625	.828
GAT	0.069/0.037	2.17	1.06–4.45	.034	.060
GGT	0.072/0.071	1.07	.584–1.86	.890	.834
AGG	0.064/0.094	0.655	.384–1.12	.120	.736
AAG	0.036/0.062	0.478	.226–1.01	.054	.237
AAT	0.090/0.097	0.926	.564–1.52	.761	.208

A genotipagem dos polimorfismos HLA-DP pode ter impacto clínico no controle da CHB. Os pacientes com polimorfismos favoráveis à eliminação de HBsAg (o mesmo para o haplótipo IL28B CG) podem ser potenciais candidatos à terapia com interferão. Observou-se que as variantes no genoma do hospedeiro influenciam a eliminação espontânea do HBsAg na CHB, como foi demonstrado na análise que envolve o HLA-DP rs3077 e o haplótipo de ambos HLA-DP e IL-28B (Seto et al., 2013).

O vírus do papiloma humano é a infecção mais comum transmitida sexualmente, no entanto apenas uma pequena percentagem leva a lesões graves (10%) ou a cancro (menos de 1%) (Metcalf et al., 2013). Indivíduos com polimorfismos no HLA que têm uma maior afinidade de ligação com os antígenos do HPV, têm um melhor reconhecimento e eliminação das infecções. Assim, foi sugerido que pode haver uma associação entre polimorfismos HLA-G e a infecção por HPV. A HLA-G é uma proteína de classe 1 (proteínas da superfície celular que apresentam antígenos às células T) que é induzida no período da gravidez e em casos de condições patológicas (doenças autoimunes, cancro, transplantes ou infecções virais). Metcalf et al. (2013) investigaram a associação entre alelos HLA-G e a prevalência do HPV. Foi recrutado um grupo de 667 mulheres e testada a infecção com HPV. Em caso afirmativo (261), fez-se a amplificação do DNA do HPV usando a técnica de PCR e posterior genotipagem. Os alelos de HLA-G foram determinados através de sequenciação das regiões nucleotídica que abrangem os exões 2-4 (1718bp). Foram divididas em 3 grupos: alfa 1 (espécies cervicais de baixo risco -  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -8,  $\alpha$ -10, e  $\alpha$ -13), alfa 2 (espécies cervicais de alto risco -  $\alpha$ -5,  $\alpha$ -6,  $\alpha$ -7,  $\alpha$ -9, e  $\alpha$ -11) e alfa 3 (espécies vaginais de baixo risco -  $\alpha$ -3 e  $\alpha$ -15). Foram feitos estes grupos com o objetivo de determinar se o HLA-G estará associado com a suscetibilidade a espécies de HPV relacionadas filogeneticamente. Das 261 mulheres, 47 testaram positivo

para o genótipo do grupo 1; 209 testaram positivo para o grupo 2; 126 testaram positivo para o grupo 3. Para calcular o efeito de cada alelo, sujeitos que testaram positivo para um alelo (homozigótico ou heterozigótico) foram comparados àqueles que testaram negativo para esse alelo, sendo que neste grupo os alelos mais prevalentes são: HLA-G 01:01:01, 01:01:02 e 01:04:01.

**Tabela 5** – Associação entre alelos e genótipos HLA-G e a prevalência de infecção por HPV [adaptado de (Seto et al., 2013)]

	HPV negative		HPV positive							
	n		Any HPV type		α Group 1		α Group 2		α Group 3	
	n		n	OR (95% CI)	n	OR (95% CI)	n	OR (95% CI)	n	OR (95% CI)
Cohort (n = 548)	287		261		42		209		126	
<i>Allele</i>										
G*01:01:01	137		141	1.02 (0.70–1.49)	28	2.23 (1.08–4.59)	111	1.15 (0.79–1.68)	79	1.70 (1.09–2.65)
G*01:01:02	74		72	0.64 (0.42–0.98)	6	0.45 (0.18–1.11)	62	1.13 (0.74–1.71)	32	0.90 (0.55–1.47)
G*01:01:03	5		3	1.38 (0.36–5.30)	1	1.14 (0.13–10.06)	3	0.67 (0.16–2.87)	1	0.39 (0.05–3.43)
G*01:04:01	213		186	1.38 (0.88–2.17)	31	0.90 (0.40–2.01)	146	0.71 (0.46–1.10)	89	0.74 (0.45–1.21)
G*01:06	4		8	0.77 (0.24–2.46)	0	n/a	6	1.54 (0.42–5.69)	6	2.72 (0.74–9.99)
<i>Genotype</i>										
<i>G01:01:01:</i>										
Homozygous	22		29	1.05 (0.55–2.00)	5	2.72 (0.86–8.60)	24	1.71 (0.89–3.28)	13	1.81 (0.84–3.90)
Heterozygous	115		112	0.88 (0.60–1.30)	23	2.14 (1.03–4.52)	87	1.05 (0.71–1.57)	66	1.69 (1.07–2.67)
Absent	133		111	1.00	12	1.00	91	1.00	44	1.00
<i>G01:01:02:</i>										
Homozygous	5		3	0.25 (0.05–1.32)	1	1.03 (0.11–9.32)	2	0.49 (0.09–2.62)	1	0.39 (0.05–3.46)
Heterozygous	69		69	0.78 (0.51–1.19)	5	0.40 (0.15–1.07)	60	1.18 (0.78–1.80)	31	0.94 (0.57–1.53)
Absent	196		180	1.00	34	1.00	140	1.00	91	1.00
<i>G01:04:01:</i>										
Homozygous	79		52	1.53 (0.88–2.65)	8	0.68 (0.24–1.89)	43	0.62 (0.36–1.07)	20	0.50 (0.25–0.97)
Heterozygous	134		134	1.35 (0.85–2.15)	23	1.02 (0.44–2.37)	103	0.77 (0.49–1.22)	69	0.89 (0.53–1.49)
Absent	57		66	1.00	9	1.00	56	1.00	34	1.00

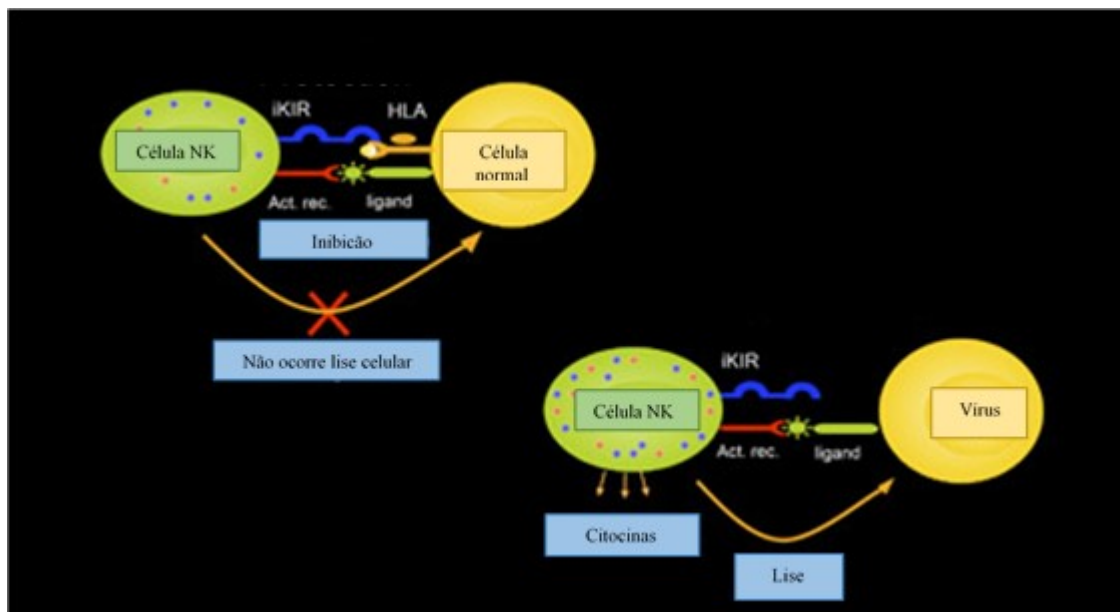
α Group 1: species 1, 8, 10, and 13.

α Group 2: species 5, 6, 7, 9, and 11.

α Group 3: species 3 and 15.

O alelo G 01:01:02 está significativamente associado com um baixo risco de infecção por HPV, enquanto que o alelo G 01:01:01 e genótipo heterozigótico G 01:01:01 estão associados a um risco aumentado de infecção em ambos os grupos 1 e 3. Também o genótipo heterozigótico G. O genótipo homozigótico G 01:04:01 demonstrou estar associado a um baixo risco de infecção no grupo 3. Este estudo corrobora a teoria que o polimorfismo no HLA-G tem influência na ocorrência de infecção por HPV, e que diferentes polimorfismos interagem de forma diferente com os vários grupos alfa HPV, contribuindo também para perceber a relação entre infecções por HPV e a resposta imune do hospedeiro (Tabela 5) (Metcalf et al., 2013).

O citomegalovírus pertence à família do vírus do herpes e na infecção primária assume-se assintomático no hospedeiro imunocompetente, sendo que uma pequena parte dos sujeitos pode exibir sintomas da infecção (febre, suor e função hepática anormal). No que respeita ao papel da defesa do hospedeiro contra o citomegalovírus, as células “natural killer” (NK) têm uma importante função, na medida em que o reconhecimento do vírus depende do HLA do hospedeiro através dos recetores “killer imunoglobulin-like” (KIRs, expressos na superfície das células NK) (Figura 17) (Di Bona et al., 2014).



**Figura 17** – Regulação da célula NK pelo KIR. As células “natural killer” expressam o KIR na sua superfície, que por sua vez vai reconhecer as moléculas de HLA das células alvo, e assim enviar um sinal à célula NK para não provocar a lise da célula em questão. Quando o KIR não reconhece o HLA, neste caso do vírus, o KIR ativador envia um sinal à célula NK, que por sua vez vai eliminar o vírus. [adaptado de ([https://home.ccr.cancer.gov/connections/2012/Vol6\\_No1/features2.asp](https://home.ccr.cancer.gov/connections/2012/Vol6_No1/features2.asp))]

Diferentes KIRs podem transmitir sinais inibitórios ou ativadores para a célula, e vários genes KIR podem gerar haplótipos que vão variar entre as variantes ativadoras ou inibitórias. Há dois haplótipos dos genes KIR que foram identificados: haplótipo A que está presente em genes KIR inibitórios (KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2 e KIR3DL3); e o haplótipo B, que é caracterizado por uma variedade de genes ativadores e inibitórios. As KIR vão ligar-se especificamente aos alelos HLA-A, HLA-B e HLA-B. Neste estudo testou-se a hipótese da interação entre a KIR e o HLA influenciar o aparecimento da infecção sintomática com CMV. Foram recrutados 60 indivíduos imunocompetentes com teste serológico positivo para infecção aguda com CMV. Como

controlo adicionaram 60 indivíduos com infeção prévia assintomática com CMV. Obteve-se DNA a partir do sangue dos indivíduos, e usando a técnica de PCR de primer específico (PCR-SSP) o DNA foi genotipado para identificação dos 3 grupos de ligandos major do KIR (HLA-C1, HLA-C2 e HLA-Bw4) (Di Bona et al., 2014).

A frequência do haplótipo A em homozigotia foi mais alta no grupo com a infeção sintomática, o que sugere que os indivíduos que não possuem os genes ativadores (AA) estão mais suscetíveis a desenvolver a infeção sintomática. O HLA-Bw4 revelou-se ser preditor do risco da infeção sintomática, influenciando o resultado da doença. De forma a verificar as diferenças entre os pacientes e os controlos, analisou-se o haplótipo BB/BA e verificou-se que a interação do HLA-Bw4 e o recetor inibitório KIR3DL1 era mais frequente nos pacientes do que nos controlos, sugerindo que a ligação HLA-Bw4-KIR3DL1 pode contribuir para contrariar a ativação dos recetores pelos pacientes sintomáticos com o haplótipo B. Isto significa que os indivíduos que possuem o haplótipo KIRAA ou o alelo HLA-Bw4 estão mais suscetíveis a desenvolver infeção aguda sintomática após a infeção primária com CMV, tendo estes polimorfismos uma importante função no hospedeiro imunocompetente (Di Bona et al., 2014).

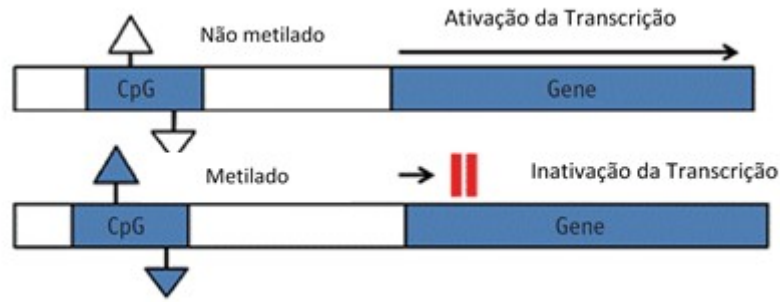
## **8. Epigenética e sua influência na suscetibilidade genética do hospedeiro às infecções orais de etiologia microbiana**

O campo da epigenética tem por objetivo compreender melhor o genoma, neste caso o humano, e conseqüentemente a expressão gênica. A estrutura base do DNA não explica na totalidade todos os mecanismos envolvidos na expressão gênica. Aliás, a resposta imunitária não é regulada apenas por fatores genéticos, sabendo-se que há um outro nível de regulação relacionado com a cromatina. A epigenética é a área que se foca nas alterações do genoma que influenciam a expressão gênica, mas sem alterar as seqüências da cadeia de DNA, consistindo assim em alterações químicas na mesma sem afetar as proteínas associadas. Ou seja, o genoma pode ter modificações funcionais significativas, sem que haja alteração da seqüência nucleotídica, e são modificações potencialmente reversíveis e de caráter transitório (Lod, Johansson, Abrahamsson, e Larsson, 2014; Seo et al., 2015)

É um processo dinâmico que sofre alterações ao longo da vida como resposta a doenças e fatores ambientais, nomeadamente a dieta, o tabaco ou a idade, que contribui para um maior conhecimento no que respeita a interações entre os genes do hospedeiro e o ambiente. Isto muitas vezes explica o porquê de indivíduos com o mesmo fenótipo responderem de forma diferente aos mesmos tratamentos (Lod et al., 2014)

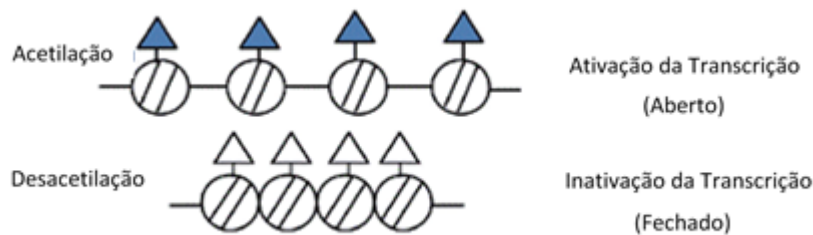
Os mecanismos que estão subjacentes às alterações epigenéticas envolvem a metilação do DNA, modificação de histonas e regulação da expressão dos genes através de RNA não codificante:

1. A metilação do DNA vai envolver a transferência covalente do grupo metil da S-adenosina metionina (SAM) para as citosinas que estão presentes em dinucleotidos de citosina-fosfato-guanina (CpG) na cadeia de DNA. Estas seqüências CpG, localizadas ao longo do genoma, são por norma altamente metiladas e associadas a sequencia repetitivas. A metilação das mesmas vai resultar numa repressão transcricional dos transcritos circundantes (Figura 18).



**Figura 18** – Sequencias metiladas do DNA nos locais CpG são causadoras de uma estrutura mais condensada [adaptado de (Seo et al., 2015)]

2. É na sequência N-terminal que ocorre a maioria da modificação das histonas. A acetilação das histonas principais vai resultar numa “abertura” na disposição da cromatina (as histonas são o elemento que lhe confere rigidez), o que vai facilitar a transcrição. Já acetilada, a sequência N-terminal vai promover uma estrutura de cromatina mais relaxada, o que admite o recrutamento dos fatores de transcrição. A metilação das histonas pode, no entanto, resultar num estado de cromatina ativado ou reprimido, uma vez que ao mesmo tempo as desacetilases removem o grupo acetil, fazendo com que a cromatina fique mais condensada (Figura 19).

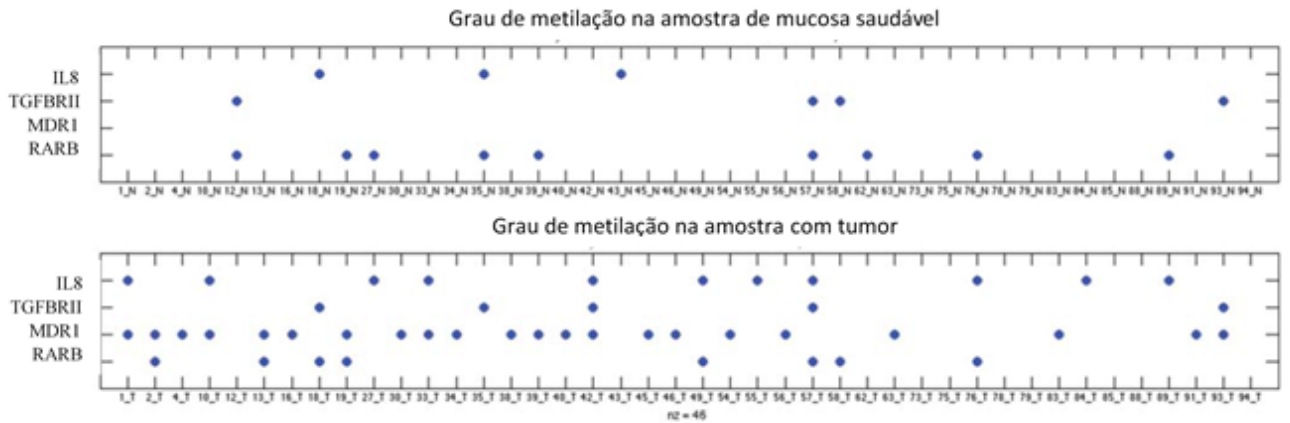


**Figura 19** – A acetilação das histonas resulta num formato aberto de cromatina; a desacetilação das histonas provoca uma maior condensação na cromatina (adaptado de (Seo et al., 2015)).

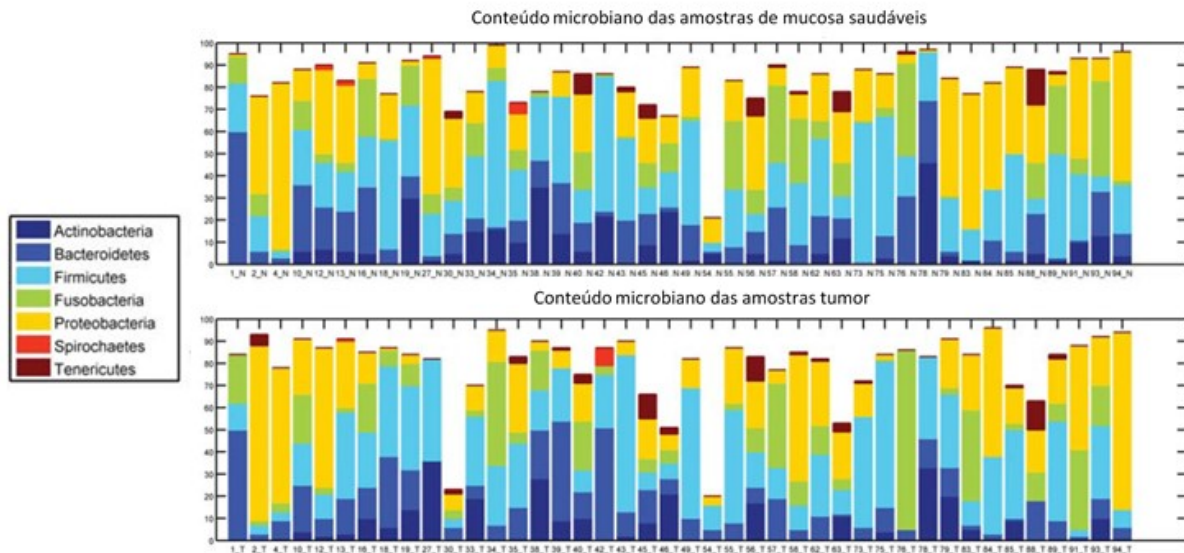
3. O RNA não codificante revela-se funcionalmente relevante, apesar não codificar para nenhuma proteína. É neste grupo que estão incluídos os micro RNAs (miRNA), que regulam negativamente a expressão dos seus genes a um nível pós transcricional. Este podem levar à repressão ou degradação do mRNA a que se ligam, através do recrutamento do complexo silenciador de RNA (Seo et al., 2015).

No que respeita às doenças da cavidade oral, nomeadamente a periodontite, a expressão génica pode estar alterada através de alterações epigenéticas, sendo que o padrão de metilação causado por mudanças na expressão génica das citocinas pode levar a doenças inflamatórias. As citocinas inflamatórias como IL1, IL4, IL6 e IL10 estão mais expressas em casos de periodontite, sendo que uma inflamação persistente leva à metilação do DNA e silencia os supressores da sinalização das citocinas levando uma expressão ativa das mesmas (Seo et al., 2015).

O carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço (HNSCC) afeta precisamente as células escamosas da cavidade oral, faringe e laringe. A principal causa deste cancro é o consumo excessivo de álcool e tabaco, infeção com o vírus do papiloma humano e do vírus Epstein-Barr, bem como uma deficiente higiene oral (Bebek et al., 2012). A inflamação associada a bactérias também tem demonstrado levar a uma supra regulação de uma enzima, a citidina desaminase, que causa mutações no DNA do genoma. Estes tipos de danos induzidos pela inflamação no DNA podem levar à sua metilação durante a carcinogénese. Uma vez que a hipometilação ocorre em resposta à inflamação crónica, é possível que possam ser considerados indicadores para o diagnóstico de tumores. A expressão diminuída do multidrug resistance gene 1 (MDR1) e a inflamação despoletada por bactérias têm ambas sido ligadas a doenças como a inflamação do intestino ou cancro gástrico. Por sua vez o MDR1 está implicado em doenças provocadas pelo tabaco, como HNSCC. De forma a explorar a relação entre inflamação, metilação somática de promotores e a microbiota oral, analisaram-se e genes relacionados com o HNSCC (IL8, RARB e TGFBR2). O IL8 codifica para uma citocina inflamatória que provoca a metilação das células epiteliais orais; o RARB demonstra uma metilação anómala dos promotores no HNSCC; a infra regulação do TGFBR2 ocorre frequentemente no HNSCC. O objetivo deste estudo foi verificar se existe uma associação entre o microbioma oral e o HNSCC. Foram recolhidas amostras de tumor e de mucosa oral de 42 indivíduos com HNSCC e após a extração do DNA procedeu-se à sua amplificação e sequenciação dos genes de rRNA. Para identificar a metilação do promotor foi feito o tratamento do DNA com bissulfito (Bebek et al., 2012).



**Figura 20** – Grau de metilação dos promotores dos genes IL8, TGFBR2, MDR1 e RARB. Cada ponto representa a presença de hipermetilação do promotor de cada gene em particular na amostra saudável e na com tumor [adaptado de (Bebek et al., 2012)].



**Figura 21** – conteúdo da subpopulação microbiana ao nível do filo da mucosa saudável e da porção com HNSCC. Cada barra representa uma amostra, e as divisões na barra mostram o seu conteúdo microbiano. [adaptado de (Bebek et al., 2012)].

Analisaram-se os genes 16 rRNA das bactérias presentes nas amostras de tumor dos pacientes, para associar a metilação do MDR1 e três outros genes associados à inflamação (IL8, RARB e TGFBR2). No geral houve uma maior metilação no promotor de todos eles, comparando com o tecido dito normal. O MDR1 demonstra a maior diferença entre as amostras saudáveis e de tumor, apresentando metilação em 0/42 e 22/42 respetivamente (Figura 20). A caracterização das bactérias revelou 7 diferentes filios nos

tecidos recolhidos, e comparando a amostra saudável e a de tumor é evidente as diferenças entre os membros de cada uma, especialmente Enterobacteriaceae (família) e Tenericutes (filó) (Figura 21). Observando o grau de metilação dos 4 genes estudados, verificou-se que nos promotores de MDR1 e IL8 este grau estava muito mais elevado comparando com as amostras saudáveis. A hipermetilação do MDR1 também se mostrou associada com uma flora microbiana específica Enterobacteriaceae (família) e Tenericutes (filó), sendo que estes dois fatores juntos diferenciam o HNSCC da mucosa oral normal. Em contraste a metilação do IL8 não está associada a nenhuma flora específica. Com este estudo provou-se que certas subpopulações microbianas no HNSCC estão fortemente associadas à metilação do promotor de MDR1 (Bebek et al., 2012).

## 9. Conclusão

As infecções endodônticas também constituem um grande problema ao nível da saúde oral, na medida em que o fracasso do tratamento endodôntico irá ditar infecções recorrentes e em último caso na perda da peça dentária. Mais uma vez as citocinas têm um papel decisivo, já que um polimorfismo na IL-1 $\beta$  é responsável por uma resposta imune mais vigorosa; sendo que os indivíduos portadores de pelo menos um alelo polimórfico têm 7 vezes mais probabilidade de desenvolver periodontite apical. A IL-8 também está envolvida na periodontite apical, uma vez que é responsável pela ativação e migração dos neutrófilos para os tecidos envolventes da raiz. Um polimorfismo nesta citocina indica que uns indivíduos são mais propensos a desenvolver a forma aguda da doença e outros a crónica.

No que respeita à cárie a saliva também vai ter um papel preponderante no seu desenvolvimento e progressão, nomeadamente através de proteínas antimicrobianas como a lactotransferrina. Foi observado que indivíduos que possuam a variante lisina em vez da arginina nesta proteína, têm uma ação significativamente mais aumentada contra a *Streptococcus Mutans*, uma bactéria cariogénica, sendo consequentemente menos propensos a desenvolver lesões de cárie cáries. Defeitos na composição do esmalte também vão ditar a suscetibilidade à cárie dentária, na medida em que indivíduos que possuem um polimorfismo no gene KRT75 vão ter um esmalte menos duro e com zonas hipomineralizadas, o que vai contribuir para a acumulação de bactérias potencialmente patogénicas.

No que respeita às infecções fúngicas, a *Candida albicans* é o fungo patogénico mais predominante na cavidade oral. Estudos revelam que mutações no gene STAT1 tornam os indivíduos mais suscetíveis a uma doença, a candidíase crónica mucocutânea, que se caracteriza por infecções por *Candida* por vários locais do corpo, incluindo a cavidade oral. Alterações na sinalização da IL-17, originadas por mutações na STAT3, que é de extrema importância na defesa do hospedeiro contra a candidíase, também tornam os indivíduos mais suscetíveis a infecções desta natureza.

Por fim, os vírus também vão ser sujeitos à atividade do hospedeiro. O HLA apresenta péptidos virais para as células T na resposta imune adquirida, e sabe-se que cada indivíduo difere nas suas proteínas HLA. Fenótipos de HLA têm sido associados à

persistência da infecção pelo vírus da hepatite B, bem como polimorfismos HLA-DP e IL-28B. Indivíduos com variantes no HLA-DP podem ter uma maior ou menor probabilidade de eliminação do HBsAg (antigénio da hepatite B) consoante o alelo que possuam, tendo assim um prognóstico mais favorável no combate a esta doença. O vírus do papiloma humano também possui manifestações orais. Indivíduos com polimorfismos no HLA que têm uma maior afinidade de ligação com os antigénios do HPV, têm um melhor reconhecimento e eliminação das infeções. Verificou-se que certos alelos deste gene podem conferir ao hospedeiro a capacidade de ter um risco de infecção mais baixo. Por sua vez, a infecção pelo citomegalovírus é reconhecida através da ligação dos recetores KIR ao HLA do hospedeiro. Haplótipos diferentes para os genes KIR vão ditar se o hospedeiro está ou mais suscetível a desenvolver infecção aguda após o CMV já estar presente.

Pode então concluir-se que, definitivamente, as características genéticas do hospedeiro têm influencia no desenvolvimento de doenças orais de etiologia bacteriana. É certo que há doenças que estão amplamente estudadas, como é o caso da periodontite, havendo inúmeras evidencias científicas que comprovam esta correlação. No entanto, no caso dos fungos já não é tanto assim, e apesar de estarem dados os primeiros passos neste campo ainda há muito espaço para novos estudos e descobertas relacionados com a genética do hospedeiro e sua capacidade de resposta perante microrganismos patogénicos.

## Bibliografia

- Amaya, M. P., Criado, L., Blanco, B., Gómez, M., Torres, O., Flórez, L., Flórez, O. (2013). Polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in a Colombian population. *International Endodontic Journal*, 46(1), 71–78.
- Bebek, G., Bennett, K. L., Funchain, P., Campbell, R., Seth, R., Scharpf, J., Eng, C. (2012). Microbiomic subprofiles and MDR1 promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Human Molecular Genetics*, 21(7), 1557–1565.
- Cantore, S., Mirgaldi, R., Ballini, A., Coscia, M. F., Scacco, S., Papa, F., De Vito, D. (2014). Cytokine gene polymorphisms associate with microbiological agents in periodontal disease: Our experience. *International Journal of Medical Sciences*, 11(7), 674–679.
- Costalonga, M., e Herzberg, M. C. (2014). The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology Letters*, 162(2), 22–38.
- Fine, D. H., Toruner, G. A., Velliyagounder, K., Sampathkumar, V., Godbole, D., e Furgang, D. (2013). A lactotransferrin single nucleotide polymorphism demonstrates biological activity that can reduce susceptibility to caries. *Infection and Immunity*, 81(5), 1596–1605.
- Finoti, L. S., Anovazzi, G., Pigossi, S. C., Corbi, S. C. T., Teixeira, S. R. L., Braido, G. V. V., Scarel-Caminaga, R. M. (2013). Periodontopathogens levels and clinical response to periodontal therapy in individuals with the interleukin-4 haplotype associated with susceptibility to chronic periodontitis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32(12), 1501–1509.
- Gale, P., Hill, A., Kelly, L., Bassett, J., McClure, P., Le Marc, Y., e Soumpasis, I. (2014). Applications of omics approaches to the development of microbiological risk assessment using RNA virus dose-response models as a case study. *Journal of Applied Microbiology*, 117(6), 1537–1548.

- Gursoy, U. K., He, Q., Pussinen, P., Huuonen, S., e Könönen, E. (2016). Alveolar bone loss in relation to tipo-Toll receptor 4 and 9 genotypes and Porphyromonas gingivalis carriage. *European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*.
- Di Bona, D., Scafidi, V., Plaia, A., Colomba, C., Nuzzo, D., Occhino, C., Caruso, C. (2014). HLA and killer cell immunoglobulin-like receptors influence the natural course of CMV infection. *Journal of Infectious Diseases*, 210(7), 1083–1089.
- Doetzer, A. D., Brancher, J. A., Pecharki, G. D., Schlipf, N., Werneck, R., Mira, M. T., Trevilatto, P. C. (2015). Lactotransferrin gene polymorphism associated with caries experience. *Caries Research*, 49(4), 370–377.
- Duverger, O., Ohara, T., Shaffer, J. R., Donahue, D., Zervas, P., Dullnig, A., Morasso, M. I. (2014). Hair keratin mutations in tooth enamel increase dental decay risk, *The Journal of Clinical Investigation*, 5219–5224.
- Hadfield, J., e David, S. (2016). A bit of a mouthful. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 548–548.
- Hajishengallis, G. (2014). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15(1), 30–44.
- Hilton, T. J., Ferracane, J. L., e Broome, J. C. (2013). *Fundamentals of Operative Dentistry: A Contemporary Approach* (4th ed.). Hanover Park: Quintessence Publishing.
- [https://en.wikipedia.org/wiki/Beta\\_defensin](https://en.wikipedia.org/wiki/Beta_defensin). Consultado em agosto 16, 2016
- <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/STAT3>. Consultado em outubro 18, 2016
- [https://home.ccr.cancer.gov/connections/2012/Vol6\\_No1/features2.asp](https://home.ccr.cancer.gov/connections/2012/Vol6_No1/features2.asp). Consultado em outubro 28, 2016.
- <http://phys.org/news/2015-05-pheromones-gut-bacteria-resistant-variants.html#jCp>. Consultado em outubro 16, 2016.
- <http://www.madrimasd.org/gestion2006/img/Noticias/Figura-2-enzibioticos.jpg>. Consultado em setembro 22, 2016
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26810/>. Consultado em outubro 18, 2016

<http://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-MicroRNA.aspx>. Consultado em julho 22, 2016

Huttenhower, C., Fah Sathirapongsasuti, J., Segata, N., Gevers, D., Earl, A. M., Fitzgerald, M. G., Segre, J. A. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214.

Jakubovics, N. S. J., e Palmer Jr, R. J. (2013). *Oral Microbial Ecology: Current Research and New Perspectives*. Norfolk: Caister Academic Press.

Jesus, A. A., e Goldbach-mansky, R. (2015). IL-1 Blockade in Autoinflammatory Syndromes1, 223–244.

Khan, S. A., Kong, E. F., Meiller, T. F., e Jabra-Rizk, M. A. (2015). Periodontal Diseases: Bug Induced, Host Promoted. *PLoS Pathogens*, 11(7), e1004952.

Kim, P. D., Xia-Juan, X., Crump, K. E., Abe, T., Hajishengallis, G., e Sahingur, S. E. (2015). Toll-like receptor 9-mediated inflammation triggers alveolar bone loss in experimental murine periodontitis. *Infection and Immunity*, 83(7), 2992–3002.

Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Periasamy, S., e Jakubovics, N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(7), 471–480.

Kornman, k. S., Crane, A., Wang, H.-Y., di Giovine, F. S., Newman, M. G., Pirk, F. W., Duffy, G. W. (1997). The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*, (24), 72–77.

Krishnan, K., Chen, T., e Paster, B. (2016). A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Diseases*.

Kumar, P. S. (2013). Oral microbiota and systemic disease. *Anaerobe*, 24(2013), 90–93.

Lamont, R. J., Hajishengallis, G. N., e Jenkinson, H. F. (2014). *Oral Microbiology and Immunology* (2nd ed.). Washington, DC: ASM Press.

Lemos, A. (2016). O papel da *Porphyromonas gingivalis* nas doenças da cavidade oral e sua relação com doenças sistémicas (Tese de Mestrado). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.

- Lod, S., Johansson, T., Abrahamsson, K. H., e Larsson, L. (2014). The influence of epigenetics in relation to oral health. *International Journal of Dental Hygiene*, 12(1), 48–54.
- Marsh, P. D., Martin, M. V., Lewis, M. A. O., e Williams, D. (2009). *Oral Microbiology* (5th ed.). Atlanta: ELSEVIER HEALTH SCIENCES.
- Metcalfe, S., Roger, M., Faucher, M.-C., Coutlée, F., Franco, E. L., e Brassard, P. (2013). The association between human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphisms and human papillomavirus (HPV) infection in Inuit women of northern Quebec. *Human Immunology*, 74(12), 1610–1615.
- Moslemi, M., Sattari, M., Kooshki, F., Fotuhi, F., Modarresi, N., Khalili Sadrabad, Z., e Shadkar, M. S. (2015). Relationship of Salivary Lactoferrin and Lysozyme Concentrations with Early Childhood Caries. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, 9(2), 109–114.
- Moutsopoulos, N. M., Lionakis, M. S., e Hajishengallis, G. (2015). Inborn Errors in Immunity: Unique Natural Models to Dissect Oral Immunity. *Journal of Dental Research*, 94(6), 753–758.
- Nibali, L., e Henderson, B. (2016). *The Human Microbiota And Human Chronic Disease*. West Sussex: JOHN WILEY e SONS INC.
- Nibali, L., Henderson, B., Sadiq, S. T., e Donos, N. (2014). Genetic dysbiosis: the Role of Microbial Insults in Chronic Inflammatory Diseases, 1, 1–10.
- Oncul, B., Karakis, D., e Dogruman Al, F. (2015). The effect of two artificial salivas on the adhesion of *Candida albicans* to heat-polymerized acrylic resin. *The Journal of Advanced Prosthodontics*, 7(2), 93–7.
- Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J. F., Liu, L., Lim, H. K., Casanova, J.-L. (2011). Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6025), 65–8.
- Santiago-Rodriguez, T. M., Naidu, M., Abeles, S. R., Boehm, T. K., Ly, M., e Pride, D. T. (2015). Transcriptome analysis of bacteriophage communities in periodontal health and disease. *BMC Genomics*, 16(1), 549.

- Seo, J.-Y., Park, Y.-J., Yi, Y.-A., Hwang, J.-Y., Lee, I.-B., Cho, B.-H., Seo, D.-G. (2015). Epigenetics: general characteristics and implications for oral health. *Restorative Dentistry e Endodontics*, 40(1), 14–22.
- Seto, W. K., Wong, D. K. H., Kopaniszen, M., Proitsi, P., Sham, P. C., Hung, I. F. N., Yuen, M. F. (2013). HLA-DP and IL28B polymorphisms: Influence of host genome on hepatitis B surface antigen seroclearance in chronic hepatitis B. *Clinical Infectious Diseases*, 56(12), 1695–1703.
- Simon-Soro, A., Tomas, I., Cabrera-Rubio, R., Catalan, M. D., Nyvad, B., Mira, A., Mira, A. (2013). Microbial Geography of the Oral Cavity. *Journal of Dental Research*, 92(7), 616–621.
- Singh, S., Sharma, P., e Shreehari, A. K. (2015). Dental Plaque Biofilm: An Invisible Terror in the Oral Cavity. *Pakistan Oral e Dental Journal*, 6(1), 422–428.
- Siqueira, J. F., e Rôças, I. N. (2013). Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 255–273.
- Steinberg, D. (2016). Dental Chatter: Bacterial Cross-Talk in the Biofilm of the Oral Cavity. *Israel Journal of Chemistry*, 56(5), 273–281.
- Struzycka, I. (2014). The oral microbiome in dental caries. *Polish Journal of Microbiology*, 63(2), 127–135.
- Teixeira, C. (2015). Microbioma endodôntico (Tese de Mestrado). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.
- Underhill, D. M., e Iliev, I. D. (2014). The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 405–16.
- Vandenbroeck, K., e Goris, A. (2003). Cytokine gene polymorphisms in multifactorial diseases: Gateways to novel targets for immunotherapy? *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(6), 284–289.
- Vidana, R., Sullivan, A., Billstrom, H., Ahlquist, M., e Lund, B. (2011). Enterococcus faecalis infection in root canals - host-derived or exogenous source? *Letters in Applied Microbiology*, 52(2), 109–115.
- Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, 69(1), 137–143.