



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ANÁLISE DO MICROBIOMA SUBGENGIVAL NA
PERIODONTITE**

Trabalho submetido por

Carolina Silva Vieira

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Setembro de 2021



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ANÁLISE DO MICROBIOMA SUBGENGIVAL NA
PERIODONTITE**

Trabalho submetido por

Carolina Silva Vieira

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

Doutora Maria Luísa Lopes Amado Baptista

e coorientado por

Mestre Catarina Pequito Izidoro de Sousa Pinto

Setembro de 2021

“Success seems to be connected to action. Successful people keep moving.

They make mistakes, but they don't quit.”

Conrad Hilton

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Doutora Maria Luísa Lopes Amado Baptista, por todo o conhecimento transmitido, disponibilidade, incentivo e confiança durante a elaboração da dissertação.

À minha coorientadora, Mestre Catarina Pequito Izidoro de Sousa Pinto, pela permanente dedicação, confiança e motivação que despertou em mim um crescente interesse pela área de Periodontologia.

A todos os Professores, que contribuíram para a minha aprendizagem e educação ao longo do meu percurso académico.

Aos meus pais, por todo o carinho, educação, amor e apoio incondicional.

Aos meus avós, os meus pilares, por todo o amor, orgulho e apoio incondicional.

À minha família, pelo apoio incondicional e muito amor.

A todos os meus amigos, por todo o incentivo, apoio e amizade.

Aos meus colegas de box, por toda a aprendizagem, interajuda, carinho e amizade.

RESUMO

A periodontite é uma consequência de respostas imunitárias destrutivas do hospedeiro a espécies bacterianas patogênicas resultantes da disbiose da microbiota oral. Sendo uma das infecções bacterianas mais comuns no ser humano, existe um interesse contínuo em avaliar a composição e montagem da microbiota subgengival associada à saúde e à doença.

Os microrganismos que formam a placa bacteriana são a principal causa da periodontite. A sua identificação e a compreensão das relações complexas e interações que envolvem estes microrganismos, os fatores ambientais e o estado de saúde do hospedeiro permitem um melhor diagnóstico e o respetivo tratamento direcionado em doentes com periodontite. Para este fim, as técnicas de diagnóstico molecular são cada vez mais utilizadas.

O desenvolvimento e a prevalência de tecnologias moleculares independentes de cultura têm proporcionado um progresso revolucionário nos estudos microbianos. A informação sobre a composição e os processos de montagem da microbiota oral podem ser utilizadas para desenvolver estratégias eficazes e protocolos de monitorização para o tratamento periodontal.

O objetivo desta dissertação consiste na caracterização e análise do microbioma subgengival na periodontite através de técnicas de diagnóstico molecular. A metodologia utilizada teve como base a pesquisa de artigos científicos em plataformas digitais como: PubMed, B-on, publicados em inglês e dos últimos 10 anos.

Palavras-Chave: Microbioma; Microbioma Subgengival; Periodontite; Gene 16 S ARNr.

ABSTRACT

Periodontitis is a consequence of destructive host immune responses to pathogenic bacterial species resulting from dysbiosis of the oral microbiota. As one of the most common bacterial infections in humans, there is a continuing interest in assessing the composition and assembly of the subgingival microbiota associated with health and disease.

The microorganisms that form dental plaque are the main cause of periodontitis. Their identification and the understanding of the complex relationships and interactions that involve these microorganisms, environmental factors and the host's health status enable improvement in diagnostics and targeted therapy in patients with periodontitis. To this end, molecular diagnostics techniques come increasingly into use.

The development and the prevalence of culture-independent molecular technologies have provided revolutionary progress in microbial studies. Information about the composition and the assembly processes of oral microbiota could be used to develop effective strategy and monitoring protocols for periodontal therapy.

The aim of this dissertation is to characterize and analyze the subgingival microbiome in periodontitis using molecular diagnostic techniques. The methodology used was based on the research of scientific articles in digital platforms such as PubMed, B-on, published in english and from the last 10 years.

Keywords: Microbiome; Subgingival Microbiome; Periodontitis; 16 S rRNA Gene.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
I. INTRODUÇÃO.....	11
II. DESENVOLVIMENTO.....	13
1. Doença Periodontal.....	13
1.1 Fisiopatologia.....	14
1.2 Diagnóstico.....	17
1.3 Nova Classificação da Doença Periodontal.....	20
1.4 Fatores de risco para o desenvolvimento da Doença Periodontal.....	24
1.4.1 Fatores de risco Modificáveis.....	24
1.4.2 Fatores de risco Não Modificáveis.....	26
1.5 Tratamento.....	27
1.6 Prevenção.....	30
2. O Microbioma Subgengival.....	30
2.1 Alterações do Microbioma Subgengival.....	31
2.2 Complexos Microbianos Subgengivais.....	32
2.3 Dinâmicas da Comunidade em Doenças Periodontais.....	36
3. Métodos de Análise do Microbioma Subgengival.....	37
3.1 Gene marcador 16S Ácido Ribonucleico Ribossomal (ARNr).....	37
3.1.1 Sequenciação do Gene 16S ARNr: Uma Nova Era na Microbiologia Periodontal.....	39
3.1.1.1 Microbioma Subgengival em Saúde e na Periodontite pela Sequenciação do Gene 16S ARNr	41
3.1.2 Sequências em UTOs.....	45
3.2 Sequenciação metagenômica <i>Shotgun</i>	47
3.2.1 Alterações na Função da Comunidade da Saúde para a Periodontite via Metatranscriptômica.....	48
3.3 Sequenciação de Próxima Geração.....	50
3.4 Hibridação ADN-ADN <i>checkerboard</i>	51
3.5 Reação em Cadeia de Polimerase.....	53
3.6 PCR em tempo real (qPCR).....	54

3.7 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	55
3.8 Pirosequenciação.....	56
4. Influência do Tratamento Periodontal no Microbioma Subgingival.....	57
III. CONCLUSÃO.....	63
IV. BIBLIOGRAFIA.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Respostas imunológicas na Periodontite (Kinane et al., 2017)	16
Figura 2- Principais fases da Doença Periodontal (Kinane et al., 2017)	19
Figura 3- Diferentes Complexos Microbianos Subgengivais (Mohanty et al., 2019).....	35
Figura 4 - Fases para caracterização do Microbioma Subgengival através do sequenciamento do gene 16S ARNr (Diaz et al., 2016)	40
Figura 5- Espécies do Microbioma Subgengival associadas à Saúde e à Periodontite (Diaz et al., 2016)	43
Figura 6- <i>Checkerboard hybridization (A)</i> Resultados da hibridização <i>checkerboard</i> utilizada para identificação de bactérias numa amostra de um doente periodontal (B) (Adaptado de Wilson et al., 2018)	52
Figura 7- Géneros bacterianos predominantes na placa subgengival (Belstrøm et al., 2018)	58
Figura 8- Espécies bacterianas predominantes na placa subgengival (Belstrøm et al., 2018)	59
Figura 9- Composição taxonómica do microbioma subgengival. (Adaptado de Shi et al., 2015)	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNr: Ácido Ribonucleico Ribossomal

BOP: *Bleeding on probing* - Hemorragia à sondagem

CAL: *Clinical attachment loss* - Perda de inserção

CO₂: Dióxido de carbono

dsDNA: *Double- Stranded DNA*

FCCG: Fluido Crevicular Gengival

FISH: *Fluorescence in situ hybridization* - Hibridização Fluorescente *in situ*

HbA1c: Hemoglobina glicada

HOMD: *Human Oral Microbiome Database*

IL-1 β : Interleucina 1-beta

NADH: Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

NGS: *Next Generation Sequencing* - Sequenciação de Próxima Geração

PCR: *Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia de Polimerase

PCR: Proteína C- reativa

PP: Pirofosfato inorgânico

TFA: Trifosfato de adenosina

TNF: Fator de necrose tumoral

UTOs: Unidade Taxonómica Operacional

I. INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica prevalente, causada pelo aumento da inflamação induzida pela formação de microrganismos disbióticos nas zonas subgengivais, que podem alterar o equilíbrio da composição microbiana no biofilme e resultar na destruição progressiva do ligamento periodontal e do osso alveolar com formação de bolsas periodontais e/ou recessão gengival (Mawardi et al., 2015). O mecanismo subjacente à destruição dos tecidos periodontais inclui danos nos tecidos causados por produtos da placa bacteriana e indução bacteriana das respostas imunitárias do hospedeiro (Mawardi et al., 2015). A periodontite é considerada a principal causa de perda dentária em adultos e, desde sempre estudada isoladamente, sem ter em conta a influência negativa no bem-estar geral dos indivíduos (Jeffcoat et al., 2014). No entanto, estudos recentes indicam que a infecção periodontal é uma potencial e constante fonte de infecção e está associada a várias doenças sistêmicas, incluindo aterosclerose, 2015, cancro, artrite reumatoide, pneumonia por aspiração e resultados adversos na gravidez (Benedyk et al., 2016; Choi et al., 2016; Pranckeviciene et al., 2014). Os mecanismos ou vias que ligam as infecções orais aos efeitos sistêmicos secundários, são infecções da cavidade oral através de bacteremia transitória, lesões causadas por toxinas microbianas orais circulantes, e, inflamação causada por lesões imunológicas induzidas por microrganismos orais. Assim, a promoção da saúde oral tem sido sugerida como forma de promover a saúde sistêmica (Cao et al., 2018).

Acredita-se que os microrganismos de um biofilme dentário estejam envolvidos na patogênese da periodontite, em particular, as bactérias subgengivais desempenham um papel importante no seu início e progressão (Shi et al., 2018).

A microbiota subgengival está decisivamente relacionada na iniciação, manutenção e progressão da doença (Belstrøm et al., 2018). O nicho subgengival oferece condições ecológicas com nutrientes disponíveis, que favorecem o crescimento de uma microbiota diversificada (Krishna et al., 2017). A abundância subgengival de microrganismos periodontopatogénicos específicos, tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* é considerada um fator de maior risco da periodontite, razão pela qual a procura destas bactérias em amostras de placa subgengival pode ser relevante em ensaios clínicos (Belstrøm et al., 2018). Apesar das bactérias subgengivais serem a principal causa das doenças periodontais, mais de metade das espécies de

bactérias subgengivais ou filótipos não estão aptos a ser cultivados, o que representa um obstáculo para perceber totalmente as relações causais entre as bactérias subgengivais e a periodontite (Laksmana et al., 2012; Tsai et al., 2018).

Para superar as dificuldades e limitações associadas ao cultivo, foram desenvolvidos métodos de cultura independentes baseados na amplificação e sequenciação de metagenomas bacterianos para identificar milhares de bactérias diferentes numa única amostra (Tsai et al., 2018).

II. DESENVOLVIMENTO

1. Doença Periodontal

O termo "doenças periodontais" engloba uma vasta variedade de condições inflamatórias crónicas da gengiva, osso e ligamento que suportam os dentes. A doença periodontal inicia-se com a gengivite, uma inflamação localizada da gengiva, iniciada por bactérias da placa dentária, ou seja, o biofilme microbiano que se forma nos dentes e na gengiva (Kinane et al., 2017; Patini et al., 2018).

As doenças periodontais são infeções multifatoriais suscitadas por um complexo de espécies bacterianas que interagem com os tecidos e células do hospedeiro, causando a libertação de uma ampla gama de citocinas inflamatórias, quimiocinas e mediadores, alguns dos quais levam à destruição das estruturas periodontais, incluindo os tecidos de suporte dos dentes, osso alveolar e ligamento periodontal (López-Martínez et al., 2020; Mohanty et al., 2019).

A periodontite é uma doença associada a alterações no microbioma subgengival (Linden et al., 2013). Apesar de não levar à morte, pode resultar em perda de dentes e redução de qualidade de vida. Durante o aparecimento e progressão da doença, as bactérias patogénicas colonizam os sulcos/bolsas periodontais para formar biofilmes orais subgengivais, que aderem primeiramente à superfície da raiz do dente, dando origem à inflamação nos tecidos periodontais (Shi et al., 2015).

A destruição do tecido, no entanto, é mediada pelo hospedeiro e é, a interação entre a comunidade subgengival de microrganismos e as respostas imunológicas que, por último, conduzem à perda de osso e tecido conjuntivo (Diaz et al., 2016).

Nas formas mais severas da doença, a destruição dos tecidos periodontais leva à perda progressiva de inserção, de osso e, por fim, de dentes. A infeção por doenças periodontais crónicas leva a uma resposta inflamatória, estando esta associada a eventuais doenças sistémicas e crónicas do doente (Shi et al., 2015).

A periodontite ocorre quando a gengivite não tratada, progride para a perda de gengiva, osso e ligamento, dando origem às bolsas periodontais profundas que são um sinal distintivo da doença e podem eventualmente levar à perda dos dentes. A doença periodontal pode contribuir para uma sobrecarga inflamatória do corpo, e agravamento de doenças como a diabetes *mellitus* e aterosclerose (Kinane et al., 2017).

A periodontite é classificada como generalizada quando afeta > 10 dos 32 dentes da dentição humana, e localizada quando estão envolvidos menos dentes. Embora a gengivite e a periodontite crónica sejam iniciadas e sustentadas pelo biofilme microbiano da placa dentária, os fatores genéticos e ambientais do hospedeiro influenciam a evolução da doença. Atualmente considera-se que as doenças periodontais partilham uma etiopatogenia semelhante (Kinane et al., 2017).

Embora a doença possa ser tratada, a saúde periodontal necessita de ser continuamente monitorizada após o tratamento inicial e controlo da doença, pelo facto da doença poder reaparecer e progredir sem sintomas óbvios em alguns indivíduos. Para o prognóstico da doença periodontal, os fatores de risco e indicadores clínicos de perda de dentes constituem um marcador importante (Shi et al., 2015).

1.1 Fisiopatologia

Para compreender a fisiopatologia da doença periodontal, é essencial conhecer o complexo biofilme dentário, bem como a resposta imunitária associada à doença (Mehrotra & Singh, 2021).

A placa dentária é um biofilme complexo, que consiste na colonização de bactérias envolvidas por uma matriz protetora. Esta matriz é composta por polissacarídeos extracelulares e glicoproteínas, que proporcionam um ambiente protetor para microrganismos no biofilme dentário (Plančak et al., 2015). Este componente do biofilme dentário torna-o 1000 a 1500 vezes mais resistente a agentes antimicrobianos (Hajishengallis et al. 2012). Os vários canais circulatórios presentes no biofilme ajudam na distribuição de muitos nutrientes e na excreção dos resíduos metabólicos gerados (Mehrotra & Singh, 2021).

A gengivite e a periodontite são iniciadas e sustentadas por microrganismos da placa bacteriana. De facto, o biofilme microbiano tem sido amplamente estudado e pode compreender à volta de 150 espécies num só indivíduo, e até ao momento foram identificadas até 800 espécies diferentes na placa dentária humana (Lourenço et al., 2014). O debate sobre quais as espécies particularmente virulentas e que podem conduzir a uma doença localizada, dura há décadas e continua por resolver (Perez- Chaparro et al., 2014). Os patogénicos putativos incluem bactérias Gram-negativas anaeróbias, espiroquetas e mesmo vírus, mas é provável que nenhum patógeno seja a causa por si só, mas antes que a própria disbiose (um desequilíbrio do biofilme microbiano) seja a "unidade" patogénica. Se a doença periodontal fosse causada por um ou alguns patógenos específicos, a estratégia terapêutica preferencial seria uma alteração direcionada da microbiota da placa em vez da remoção total do biofilme (Al-hebshi et al., 2015; Kinane et al., 2017; Perez- Chaparro et al., 2014).

"*Quorum sensing*" é um modo de comunicação entre as microcolónias de bactérias dentro do biofilme dentário (Plančak et al., 2015). "Autoindutores" são moléculas secretadas por microrganismos; a concentração destas moléculas ajuda na regulação da expressão genética bacteriana (Plančak et al., 2015). O biofilme, através de diferentes concentrações de pH e metabolitos, tem vários microambientes. Estes microambientes tornam o ecossistema adequado para uma variedade de microrganismos que habitam na mesma placa bacteriana (Mehrotra & Singh, 2021).

A camada inicial depositada sobre a superfície dos dentes na formação da placa bacteriana é a "película adquirida". Esta camada é formada segundos após a exposição das superfícies dentárias, seguida da fixação inicial dos primeiros colonizadores do biofilme (Mehrotra & Singh, 2021).

As espécies *Streptococcus* e *Actinomyces* são colonizadores primários, bactérias gram-positivas facultativas. Os "receptores de adesão" presentes na superfície dos colonizadores primários ligam-se às proteínas ricas em prolina da película. Esta ligação leva à revelação de locais receptores conhecidos como "criptitopo", e ainda mais à co-agregação. Gradualmente, há uma deposição de camadas de placa bacteriana que conduz a uma deficiência de oxigénio no ambiente, e que pode levar eventualmente à colonização de bactérias anaeróbias. O microrganismo de ligação entre os colonizadores primários e

secundários é a espécie *Fusobacterium*. A mudança gradual destas condições aeróbias para condições anaeróbias marca a progressão da gengivite para periodontite (Mehrotra & Singh, 2021).

A resposta do hospedeiro à infecção bacteriana é feita de forma gradual através da resposta imunitária inata clássica. Esta resposta inclui sinais de inflamação aguda, incluindo aumento do rubor da gengiva, hemorragia e edema gengival, bem como migração de neutrófilos para o local da inflamação (Larsen & Fiehn., 2017; Mehrotra & Singh, 2021).

A imunidade inata (Figura 1) também ativa as células hospedeiras primárias do corpo, preparando o corpo para a defesa contra infecções bacterianas, bem como desencadeia a imunidade adaptativa. A imunidade inata também desencadeia a célula hospedeira a diferenciar-se em células mais específicas, por sua vez, aumentando os mediadores pró-inflamatórios como a interleucina 1-beta (IL-1 β), prostaglandinas e o fator de necrose tumoral (TNF). A cascata é ativada, resultando na imunidade adaptativa (Figura 1) ao entrar em função, ativando linfócitos específicos T e B (Silva et al., 2015). Existe documentação sobre o papel do envolvimento das células B e T com o ativador recetor do fator nuclear-kB (*Receptor activator of nuclear factor kappa-B [RANK]*) que resulta em perda de osso devido à ativação de osteoclastos (Mehrotra & Singh, 2021).

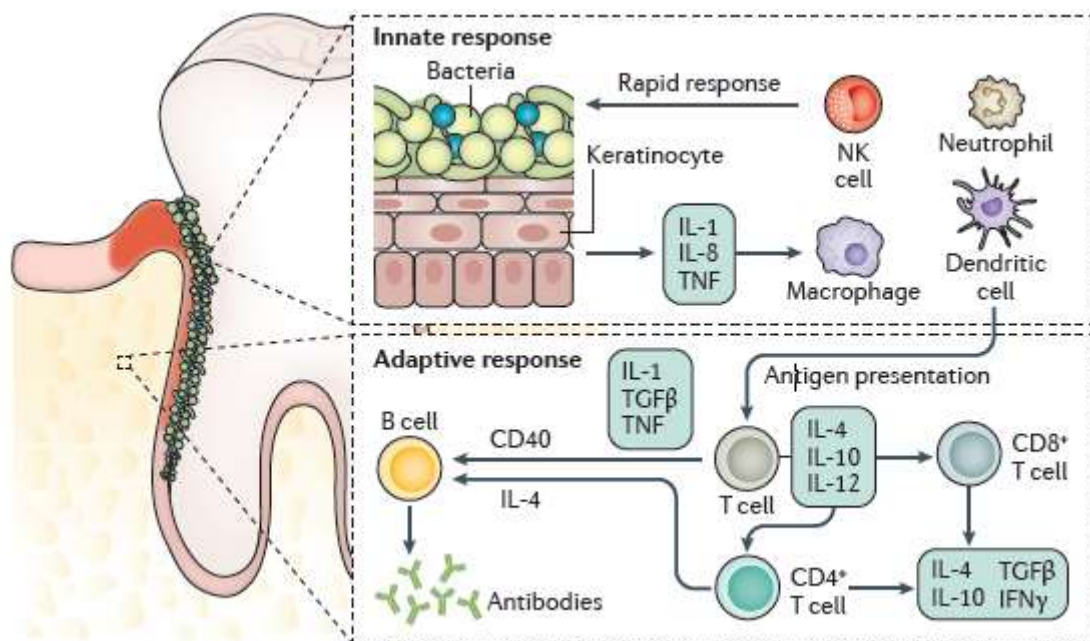


Figura 1- Respostas imunológicas na Periodontite
(Adaptado de Kinane et al., 2017)

A bactéria oral comensal é responsável pela iniciação e propagação da doença através do processo de disbiose, ou desequilíbrio microbiano. A doença prossegue ciclicamente com períodos de atividade ou inatividade até que sejam tomadas medidas terapêuticas, ou até que o dente e as estruturas circundantes sejam destruídos pelo processo da doença, resultando na perda do dente. À medida que a doença periodontal evolui da gengivite para a periodontite, um maior número de organismos anaeróbios coloniza bolsas periodontais mais profundas, tais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*, o que desencadeia a resposta inflamatória no hospedeiro. Esta resposta inclui a produção e disseminação de proteína C-reativa (PCR), um biomarcador de inflamação, bem como vários compostos neutrófilos e macrófagos como o TNF- α , metaloproteinases de matriz (MMPs), e IL-1 e IL-8. Um nível elevado de PCR sérico sugere que a inflamação resultante da periodontite pode estar correlacionada com uma patologia cardiovascular (Borgnakke, 2015; Gasner & Schure, 2020).

1.2 Diagnóstico

O diagnóstico da doença periodontal requer a comparação dos resultados em relação ao periodonto saudável. Esta comparação é baseada no exame visual, na sondagem periodontal e na avaliação dos níveis de osso observados radiograficamente (Gasner & Schure, 2020).

O primeiro desafio no tratamento da doença periodontal é um diagnóstico atempado e preciso, uma vez que a perda de osso e tecido mole é progressiva e em grande parte irreversível, sendo, no entanto, particularmente difícil uma vez que a doença periodontal precoce é indolor e os pacientes raramente procuram cuidados na fase inicial da doença. De facto, o sintoma inicial da gengivite é a hemorragia durante a escovagem; a dor raramente é relatada (Gasner & Schure, 2020).

As características clínicas da periodontite incluem rubor, alteração da textura e edema gengival, hemorragia da área da bolsa gengival durante a sondagem, aumento da profundidade da bolsa periodontal (detetado por uma sonda de diâmetro estreito - Figura 2), destruição das estruturas de suporte dos dentes (ligamento e osso alveolar), recessão da margem gengival (que expõe a raiz), aumento da mobilidade dentária e, eventualmente, perda de dentes. A dor pode surgir com exacerbações agudas devido a

abcessos ou deslocamento dos dentes causado pelo enfraquecimento do suporte dentário. No entanto, a doença periodontal típica é indolor, e é comum que possa atingir graus avançados de severidade antes de ser detetada e iniciar-se tratamento (Kinane et al., 2017).

O diagnóstico baseia-se principalmente numa série de medições clínicas que incluem nível de inserção, hemorragia à sondagem, profundidade da sondagem e resultados radiográficos. Informação adicional, tais como história médica e familiar e características clínicas específicas (por exemplo, a localização das lesões ou a quantidade de placa relativa à progressão da doença), pode ajudar a distinguir diferentes tipos de doenças periodontais. No entanto, um diagnóstico preciso requer registo de múltiplos parâmetros (incluindo hemorragia à sondagem, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica) em seis localizações por dente (afetado ou não). Estes parâmetros clínicos são as melhores medidas atualmente disponíveis para diagnóstico; no entanto, só conseguem avaliar a atual extensão e severidade da doença. Nenhuma informação pode ser extrapolada sobre a atividade futura da doença, devido à baixa sensibilidade e baixo valor preditivo positivo destes testes (Stathopoulou et al., 2015).

O periodonto saudável apresenta uma gengiva cor rosa claro, com uma textura pontilhada, que está bem-adaptada ao osso subjacente. Entre a gengiva e o dente, existe um sulco fisiológico de 1 a 3 mm que normalmente não apresenta sinais de hemorragia (Gasner & Schure, 2020).

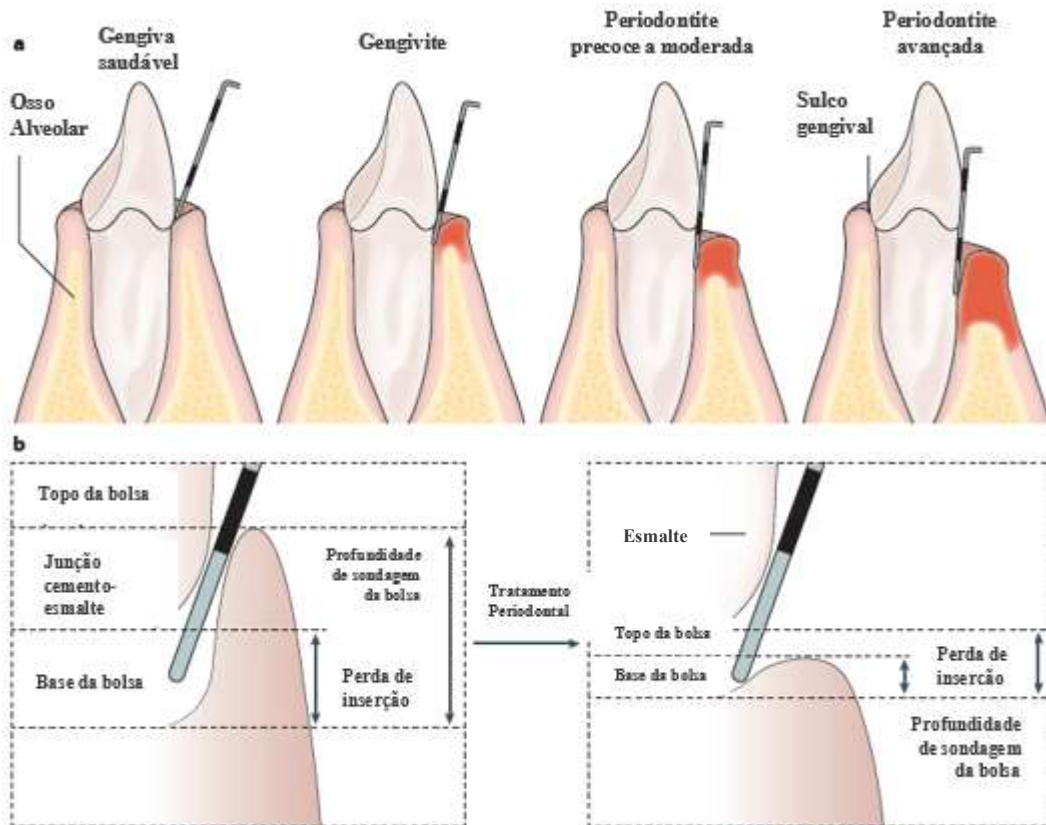


Figura 2 - Principais fases da doença periodontal

a) Esquema de Gengiva saudável, Gengivite, Periodontite precoce a moderada e Periodontite avançada b) Medição da profundidade da bolsa

(Adaptado de Kinane et al., 2017)

Os sinais da doença periodontal incluem hemorragia ativa em resposta a manipulação ligeira ou inexistente dos tecidos, dor, mau hálito, bolsas periodontais (>3mm), perda óssea radiográfica, perda de inserção clínica, e perda de dentes. As radiografias de um doente com periodontite irão revelar a perda de osso alveolar em proximidade a uma profundidade de sondagem periodontal. Estes resultados sugerem que existe uma bolsa periodontal profunda associada ao dente que contém os microrganismos periodontopatogénicos que estão a desencadear ativamente a resposta do hospedeiro. Se não for tratada, a perda de osso irá progredir até que haja um inadequado suporte do dente, e o dente associado tornar-se-á móvel e eventualmente perdido (Gasner & Schure, 2020).

Realizado o diagnóstico, deve-se remover imediatamente os fatores etiológicos (o biofilme microbiano nas superfícies dos dentes e gengiva) e aconselhar o doente sobre os possíveis fatores de risco (por exemplo, má higiene oral, tabagismo e diabetes *mellitus* não controlada). Devido ao facto dos fatores de risco modificáveis serem

predominantemente da esfera de controlo do doente, a gestão bem-sucedida da periodontite depende fortemente da motivação do doente e das mudanças de comportamento e é, por conseguinte, um desafio (Kinane et al., 2017).

1.3 Nova Classificação da Doença Periodontal

A Associação Americana de Periodontologia (AAP) e *European Federation of Periodontology* (EFP) realizou em novembro de 2017, no evento “*The World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*”, o qual decorreu em Chicago, uma nova classificação das doenças periodontais e peri-implantares. Diversos peritos analisaram as evidências científicas existentes e desenvolveram critérios chave de modo a obterem uma classificação universal, globalmente aceite, capaz de responder às necessidades dos clínicos, permitindo assim a padronização dos conceitos. Foram realizadas alterações significativas na classificação precedente, a classificação de 1999, através do trabalho conjunto de uma equipa com mais de 100 especialistas (Costa et al., 2019).

A nova classificação foi criada para dar resposta às fragilidades precedentes, visto que com o contínuo desenvolvimento científico no âmbito da Periodontologia, surge a necessidade de se reformular os sistemas de classificação. O sistema de classificação proposto em 1999, veio substituir o sistema de classificação de 1989, apresentando soluções para alguns aspetos que não agradavam a comunidade científica (a classificação de 1989 não abrangia todas as categorias da doença; não contemplava as doenças gengivais; não tinha em conta as taxas de progressão da doença e a sua relação com a idade). Do mesmo modo, a nova classificação periodontal proposta em 2017, atua em algumas das falhas da classificação de 1999. São exemplos de limitações da classificação de 1999: o facto de esta não permitir classificar casos de recessão e perda de adesão devido ao historial de periodontite crónica; ao designar um tipo de periodontite de “agressiva”, pode levar a que se considere, erradamente, que outros tipos de periodontite não se possam expressar de forma agressiva; sempre que se perdiam dentes com pior prognóstico periodontal, a severidade da doença diminuía.

Esta nova classificação, fruto de um grande estudo e entendimento do estado de arte, apresenta-se com um carácter dinâmico, com grande adaptabilidade e foi concebida de maneira a que pudesse ser implementada no ambiente clínico, mas também no âmbito da investigação e de estudos epidemiológicos (Costa et al., 2019).

Assim, a classificação permite ao clínico incorporar fatores individuais do doente no diagnóstico, que são cruciais para uma abordagem detalhada dos casos.

Formas de periodontite (Caton et al., 2018):

1. Doenças periodontais necrosantes
 - a) Gengivite Necrosante
 - b) Periodontite Necrosante
 - c) Estomatite Necrosante
2. Periodontite como manifestação de doenças sistémicas
3. Periodontite
 - a) Estadio: Classifica a doença consoante a sua severidade e complexidade
Estadio I: Periodontite inicial
Estadio II: Periodontite moderada
Estadio III: Periodontite severa com potenciais perdas dentárias
Estadio IV: Periodontite severa com potencial perda da dentição
 - b) Extensão e distribuição: localizada, generalizada e padrão molar- incisivo
 - c) Grau: Representa o risco de progressão da doença
Grau A: Taxa de progressão baixa
Grau B: Taxa de progressão moderada
Grau C: Taxa de progressão rápida

A periodontite é definida como “doença inflamatória crónica multifatorial associada com biofilme disbiótico e caracterizada pela destruição progressiva dos tecidos de suporte do dente”. Clinicamente, caracteriza-se em (Steffens & Marcantonio, 2018):

1. Perda de inserção detetada em dois ou mais locais interproximais não adjacentes;
ou
2. Perda de inserção de 3 mm ou mais na vestibular ou lingual/palatina em pelo menos 2 dentes, sem que a causa seja por: 1) recessão gengival de origem

traumática; 2) cárie dentária estendendo-se até a área cervical do dente; 3) presença de perda de inserção na face distal de um segundo molar e associado ao mau posicionamento ou à extração de terceiro molar; 4) lesão endo-periodontal que drena através do periodonto marginal; ou 5) ocorrência de fratura radicular vertical.

A periodontite é classificada de acordo com o Estadio e o Grau (Steffens & Marcantonio, 2018):

Os **estádios** da periodontite devem ser primariamente definidos pela perda de inserção clínica, denominada como “característica determinante”. Na sua ausência, utiliza-se a perda óssea radiográfica. Caso haja “fatores de complexidade” (por exemplo, defeitos de furca ou mobilidades avançadas), sobe-se o estadio ao pior cenário encontrado, de acordo com o descrito abaixo em “fatores que modificam o estadio”. Em pacientes tratados, o estadio não deve diminuir. Para todos os estádios, deve-se classificar ainda quanto à extensão: localizada (até 30% dos dentes afetados), generalizada (30% dos dentes ou mais) ou padrão molar-incisivo.

Estadio I: Característica determinante: 1-2 mm de perda de inserção interproximal no pior local ou perda radiográfica no terço coronal (< 15%). Características secundárias: máxima profundidade de sondagem até 4 mm, sem perda dentária devido à periodontite e padrão de perda óssea predominantemente horizontal.

Estadio II: Característica determinante: 3-4 mm de perda de inserção interproximal no pior local ou perda radiográfica no terço coronal (15-30%). Fatores que modificam o estadio: máxima profundidade de sondagem até ≤ 5 mm, sem perda dentária devido à periodontite e padrão de perda óssea predominantemente horizontal.

Estadio III: Característica determinante: 5 mm ou mais de perda de inserção interproximal no pior local ou perda óssea radiográfica que se estende à metade ou ao terço apical da raiz. Fatores que modificam o estadio: profundidade de sondagem de 6mm ou mais, com perda dentária devido à periodontite até 4 dentes. Em adição ao estadio II de complexidade pode existir perda óssea vertical até ≥ 3 mm, defeitos de furca grau II ou III e defeitos de crista moderados.

Estadio IV: Característica determinante: 5 mm ou mais de perda de inserção interproximal no pior local ou perda óssea radiográfica que se estende à metade ou ao terço da raiz. Fatores que modificam o estadio: perda dentária de 5 ou mais dentes devido à periodontite. Em adição aos fatores de complexidade ao estadio III, pode ocorrer disfunção mastigatória, trauma oclusal secundário (mobilidade grau 2 ou 3), defeito de crista severo, colapso de mordida, má posição dentária, migração patológica, menos de 20 dentes remanescentes.

O **grau** reflete as evidências, ou o risco, de progressão da doença e seus efeitos na saúde sistêmica. Inicialmente, todos os doentes com periodontite devem ser considerados como grau B e, assim, modificar esse grau (para A ou C) de acordo com: 1) evidências diretas de progressão; ou 2) evidências indiretas. Após a determinação do grau da periodontite pela evidência de progressão, o grau pode ser modificado pela presença de fatores de risco (tabagismo e diabetes *mellitus*).

Grau A – Taxa de progressão baixa

Característica determinante: evidência direta de nenhuma progressão de perda de inserção em 5 anos ou indireta de perda óssea/idade até $< 0,25$ mm. Características secundárias: depósitos densos de biofilme com níveis baixos de destruição. Fatores de risco que podem modificar o grau: sem fatores de risco (hábitos tabágicos ou diabetes *mellitus*).

Grau B – Taxa de progressão moderada

Característica determinante: evidência direta de progressão inferior a 2 mm em 5 anos ou indireta de perda óssea/idade de 0,25 a 1 mm. Características secundárias: destruição proporcional com os depósitos de biofilme. Fatores de risco que podem modificar o grau: fumadores até < 10 cigarros por dia ou HbA1c $< 7\%$ em diabéticos.

Grau C – Taxa de progressão rápida

Característica determinante: evidência direta de progressão igual ou superior a 2 mm em 5 anos ou indireta de perda óssea/idade superior a 1 mm. Características secundárias: a destruição excede o que seria expectável com os depósitos de biofilme. Padrões clínicos específicos sugestivos de períodos de rápida progressão e/ou doença de início precoce.

Fatores de risco que podem modificar o grau: hábitos tabágicos (10 ou mais cigarros/dia) ou doentes com diabetes *mellitus* (HbA1c igual ou superior a 7%).

1.4 Fatores de risco para o desenvolvimento da Doença Periodontal

Há mais de um século que se estuda e procura os agentes etiológicos das doenças periodontais. A pesquisa iniciou-se na “era de Ouro da Microbiologia” (aproximadamente 1880–1920), quando os agentes etiológicos de várias infecções clinicamente importantes foram determinados, investigações paralelas da etiologia das doenças periodontais foram iniciadas nesta altura (Mohanty et al., 2019).

A colonização bacteriana mista no tecido oral é o agente etiológico primário na doença periodontal. Existem outros fatores que atuam como fatores etiológicos secundários, acelerando a propagação e desenvolvimento de doenças periodontais como o desenvolvimento de bolsas, cálculo, placa bacteriana, restaurações debordantes, características anatómicas como as raízes curtas, lesões cervicais não cariosas, fatores sistêmicos, fatores genéticos, tabagismo e stress (Mehrotra & Singh, 2021).

As doenças periodontais surgem como resultado de vários fatores, incluindo fatores de risco específicos do doente e uma higiene oral inadequada. Os fatores de risco podem ser subdivididos em fatores de risco modificáveis, tais como má higiene oral, tabagismo, diabetes, e gravidez, e fatores de risco não modificáveis, que incluem idade e hereditariedade, incluindo doenças genéticas (Gasner & Schure, 2020).

1.4.1 Fatores de risco Modificáveis

As práticas de má higiene oral desempenham um papel significativo na iniciação e desenvolvimento da doença periodontal. Técnicas inadequadas de higiene oral podem levar à acumulação de bactérias e placa nos dentes, dando início a uma gengivite e progredindo potencialmente para a periodontite. Esta relação tem sido demonstrada na literatura, estando a crescente acumulação da placa dentária diretamente associada ao aumento da gravidade e prevalência das doenças periodontais. Como consequência de uma má higiene oral, os organismos anaeróbios responsáveis pela progressão das doenças periodontais podem colonizar-se em áreas mais profundas do periodonto, e aí executar as

suas ações destrutivas. As principais bactérias encontradas na periodontite incluem *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, e *Tannerella forsythia*. Quando penetram profundamente no periodonto, estes organismos produzem inflamação desencadeando a liberação de mediadores inflamatórios, e outros produtos defensivos do hospedeiro (Gasner & Schure, 2020; Nazir, 2017).

O tabagismo é o maior fator de risco modificável para a doença periodontal, como demonstrado em estudos de associação, progressão e intervenção, com estimativas de risco atribuíveis que variam entre 2,5 e 7,0. Os fumadores têm uma condição periodontal pior e experienciam uma perda de dentes mais severa do que os não-fumadores (Kinane et al., 2017; Leite et al., 2018).

O tabagismo pode aumentar o risco de doenças periodontais 5 a 20 vezes, com uma razão de probabilidade de 5,4 entre o tabagismo e a periodontite. Está associado a maiores níveis de perda de osso, perda de fixação, bolsas periodontais profundas associadas à doença, e perda de dentes, em comparação com os não fumadores. Para além do aumento da severidade das doenças periodontais, o tabagismo também está associado a um decréscimo significativo na eficácia dos tratamentos (Kinane et al., 2017; Leite et al., 2018).

Este fator de risco cria um ambiente cada vez mais favorável ao crescimento de microrganismos periodontopatogénicos, promovendo assim o desenvolvimento da doença (Gasner & Schure, 2020).

Estudos prospetivos, demonstraram taxas de progressão mais elevadas de periodontite e de perda dentária, e estudos de tratamento demonstraram resultados inferiores de tratamento periodontal cirúrgico e não cirúrgico em fumadores, em comparação com os não fumadores. Notavelmente, os sinais de inflamação gengival podem ser menos pronunciados nos fumadores do que nos não fumadores, devido à vasoconstrição e ao aumento de queratinização do tecido gengival (Kinane et al., 2017).

A diabetes *mellitus* é também uma das maiores responsáveis pela doença periodontal. Está associada a certos processos patológicos que acentuam o *breakdown* periodontal, tal como prejudicam a cicatrização de feridas. Em doentes com diabetes *mellitus*, a doença periodontal correlaciona-se com o aumento do risco de mortalidade quando comparado com doença ausente ou ligeira (Gasner & Schure, 2020; Nazir, 2017).

A prevalência e severidade da periodontite são aumentadas em indivíduos que têm diabetes *mellitus* de longa duração, e, em particular, em pacientes com controlo deficiente. Em contrapartida, a periodontite pode ter um efeito negativo no controlo metabólico em indivíduos com diabetes *mellitus*, uma vez que contribui para o aumento da carga inflamatória e resistência à insulina. Em particular, os efeitos negativos da diabetes *mellitus* no periodonto manifestam-se numa idade jovem, afetando crianças e adolescentes com diabetes *mellitus* tipo 1 ou tipo 2 (Kinane et al., 2017).

A gravidez está associada a flutuações dos níveis hormonais, alterações estas que têm demonstrado promover uma resposta inflamatória que está ligada à gengivite e periodontite. Embora não tenham sido claramente compreendidas, as hormonas maternas mostraram estar positivamente correlacionadas com os níveis de *Porphyromonas gingivalis*, um microrganismo chave na progressão da doença periodontal. Tanto o hipoestrogenismo como o hiperestrogenismo têm demonstrado contribuir para a gengivite (Daalderop et al., 2018; Gasner & Schure, 2020).

1.4.2 Fatores de risco Não Modificáveis

A idade é um fator de risco não modificável da doença periodontal, amplamente discutido na literatura. Foi demonstrado que indivíduos de idade avançada têm uma resposta inflamatória exacerbada à acumulação de placa bacteriana, com um maior número de células inflamatórias. Esta agregação de células inflamatórias coloca os indivíduos mais velhos em maior risco de sofrer a destruição do periodonto (Gasner & Schure, 2020).

Além disso, devido ao envelhecimento estar associado a uma perda de destreza, os indivíduos de idade avançada tendem a ser menos proficientes nas suas práticas de higiene oral. Isto resulta em níveis mais elevados de placa bacteriana, o que constitui um fator de

risco conhecido para o desenvolvimento da doença periodontal. Adicionalmente, a investigação tem demonstrado uma maior perda de inserção clínica (CAL) em indivíduos com idades compreendidas entre os 60 e os 90 anos, em comparação com os que têm menos de 50 anos (Gasner & Schure, 2020).

As predisposições genéticas têm sido consideradas importantes tanto para o início como para a progressão da periodontite, com altas estimativas de hereditariedade que chegam a 50%. Contudo, estudos de associação de genoma disponíveis até à data, não conseguiram identificar consistentemente polimorfismos específicos de nucleótidos únicos entre as populações. Em contraste com as doenças mendelianas, em que o fenótipo patológico é tipicamente o resultado de uma anormalidade que afeta um único gene, a predisposição genética para a periodontite é provavelmente conferida coletivamente por centenas ou milhares de genes, enquanto o fenótipo clínico é definido pela interação entre fatores ambientais, genéticos e epigenéticos. Os fatores epigenéticos só ganharam atenção recentemente, e aguarda-se ainda investigação adicional sobre o seu papel (Kinane et al., 2017).

Por último, várias doenças sistémicas geneticamente relacionadas têm-se manifestado como doenças periodontais. A etiologia do desenvolvimento de doenças periodontais dentro destas doenças sistémicas também tem sido documentada na literatura. Estas doenças incluem a síndrome de Down, síndrome de Ehlers-Danlos (tipos IV e VIII), e doença de Crohn (Gasner & Schure, 2020).

1.5 Tratamento

O tratamento da doença periodontal envolve uma abordagem por etapas, começando com opções mais conservadoras. A fase inicial do tratamento para todas as formas de periodontite é uma profilaxia, que inclui a raspagem e alisamento radicular para remover a placa bacteriana e os cálculos encontrados tanto acima como abaixo da linha da gengiva. Uma parte importante desta limpeza dentária é a instrução de higiene oral dada pelo médico dentista ao paciente para melhorar a sua rotina de higiene oral em casa (Gasner & Schure, 2020; Kinane et al., 2017).

Após a conclusão da consulta de limpeza dentária, o paciente deve regressar para uma reavaliação da condição periodontal, que envolve um exame que observa o estado do periodonto, e mede a profundidade de sondagem para ver se o progresso da doença foi detido. Se a resolução da condição puder ser confirmada, o doente deve regressar para destartarizações regulares, uma vez que a periodontite é uma doença crónica que pode reativar se o ambiente adequado o permitir (Gasner & Schure, 2020).

A supervisão mais importante para controlo da doença periodontal é o tratamento dos fatores de risco. A higiene oral inadequada é um dos principais promotores da doença periodontal. A prevenção de más práticas de higiene oral envolve a promoção de uma higiene oral adequada, e a manutenção a intervalos regulares, dependendo do risco individual do paciente. O autocuidado recomendado utiliza um regime diário de três etapas que inclui escovagem, fio dentário e bochecho. O encaminhamento para realizar a destartarização e o acompanhamento programado para monitorizar a progressão da doença é também recomendado (Gasner & Schure, 2020; Kinane et al., 2017).

O principal objetivo do tratamento periodontal é melhorar a saúde gengival do doente e preservar os tecidos periodontais remanescentes. Ambos os fatores locais, bem como a carga bacteriana de microrganismos periodontopatogénicos requerem redução, e em simultâneo a correção de fatores comportamentais (Mehrotra & Singh, 2021).

Após a avaliação clínica e radiográfica do doente, é preenchido o periodontograma juntamente com o registo dos índices periodontais para medir a severidade e extensão da doença. Após a avaliação clínica, o doente deve receber aconselhamento para iniciar mudanças comportamentais como a cessação do tabagismo e motivação para melhorar as medidas de higiene oral. Seguida pela avaliação, inicia-se o tratamento periodontal não cirúrgico, que inclui a raspagem e o alisamento radicular (Graziani et al., 2017; Mehrotra & Singh, 2021).

A revisão regular do tratamento periodontal não cirúrgico é crítica, uma vez que os locais que não respondem têm de ser tratados por tratamento periodontal cirúrgico, seguido de uma fase de manutenção periodontal (Graziani et al., 2017; Mehrotra & Singh, 2021).

O tratamento periodontal não cirúrgico consiste na remoção da placa bacteriana supragengival, subgengival e cálculo, com raspagem e alisamento radicular. A raspagem e alisamento radicular são realizados com curetas ou instrumentos ultrassônicos, ou ambos (Aimetti, 2014; Kinane et al., 2017).

As curetas são instrumentos afiados com um ou dois bordos cortantes utilizados para a remoção de cálculos e placa, tanto supragengival como, em particular, subgengival, o que é crucial na doença periodontal; as versões ultra-sônicas destes instrumentos vibram na faixa ultra-sônica (aproximadamente 25.000-30.000 ciclos por segundo) e podem ser utilizados, juntamente com um jato de água, para remover depósitos aderidos aos dentes. Tanto os instrumentos manuais como os ultra-sônicos são eficazes na remoção do cálculo subgengival e na alteração da microbiota subgengival (Kinane et al., 2017; Suvan et al., 2019).

Além disso, ambos os instrumentos conseguem melhorias comparáveis nos parâmetros clínicos (redução da profundidade de sondagem, aumento do nível de inserção clínica e redução da hemorragia à sondagem) (Kinane et al., 2017; Suvan et al., 2020).

Uma vez concluída a raspagem inicial e o alisamento radicular, é necessário um período de 4-6 semanas para a cicatrização adequada do tecido conjuntivo, antes da reavaliação. Durante a consulta de reavaliação, as medições clínicas de diagnóstico são novamente registadas e a resposta ao tratamento inicial é avaliada (Kinane et al., 2017; Suvan et al., 2020).

Se não houver dentes com inflamação residual e bolsas, então o paciente é colocado em manutenção periodontal. No entanto, se houver inflamação residual e doença ativa, é necessário tratamento adicional, que pode ser localizado ou generalizado, cirúrgico ou não cirúrgico, dependendo da extensão e severidade da inflamação residual (Kinane et al., 2017).

1.6 Prevenção

A prevenção da gengivite é uma medida preventiva primária da periodontite e implica retardar a formação do biofilme microbiano e/ou erradicá-lo em intervalos regulares. A prevenção é conseguida com uma higiene oral auto-realizada numa base diária e a eliminação do biofilme numa base bienal, embora dados recentes indiquem que, para pacientes de baixo risco que têm poucos ou nenhuns fatores de risco, a profilaxia profissional numa base anual pode ser adequada (Kinane et al., 2017).

As recomendações da *American Dental Association* (ADA) para os cuidados diários no domicílio, incluem escovar os dentes duas vezes por dia durante 2 minutos com uma escova de dentes macia, escovar a língua, limpar os espaços interdentários (com fio dentário ou escovas interproximais), utilizar uma pasta de dentes com flúor e ter uma dieta equilibrada com snacks limitados entre as refeições (Giannobile et al., 2013; Kinane et al., 2017).

2. O Microbioma Subgengival

A cavidade oral aloja uma microbiota natural e diversa que persiste nas superfícies orais assim como na estrutura, e multi-espécies de biofilmes que se organizam funcionalmente e que têm uma relação simbiótica com o hospedeiro. O hospedeiro proporciona um habitat quente e nutritivo, enquanto a microbiota oral residente proporciona importantes benefícios para a saúde (por exemplo, exclusão de agentes patogénicos, modulação imunitária, redução do ciclo nitrato entero-salivar) (Genco et al., 2018; Naginyte et al., 2019).

A microbiota oral é composta por uma combinação de vírus, protozoários, fungos, arqueobactérias e bactérias. Historicamente, a composição da microflora subgengival tem sido caracterizada por métodos de cultura. No entanto, as técnicas de cultura apresentam importantes inconvenientes. Por exemplo, apenas bactérias viáveis podem crescer em meios de cultura específicos e são essenciais condições rigorosas de amostragem e transporte. Além disso, se forem utilizados meios não seletivos, a sensibilidade da cultura de bactérias pode ser particularmente baixa, com limites de deteção em média de 10³-10⁴

células bacterianas. Assim, são necessários números elevados de uma bactéria específica numa amostra para permitir a sua deteção (López -Martínez et al., 2020).

As bactérias que colonizam os tecidos duros e moles da cavidade oral influenciam profundamente a saúde oral e a doença. Estudos microbiológicos identificaram mais de 700 espécies de microrganismos na cavidade oral, incluindo um grande número de espécies não cultiváveis (~50%), mais de 400 das quais foram detetadas no sulco ou bolsa periodontal, as restantes espécies foram identificadas a partir de outros habitats orais como a língua, mucosas orais e lesões cariosas (Wei et al., 2019).

Existem evidências reconhecidas do papel da microbiota oral na etiologia das doenças periodontais e alguma especificidade entre certas espécies ou grupos de espécies bacterianas e as várias formas de doenças periodontais. Contudo, embora a complexidade e diversidade da microbiota periodontal tenham sido confirmadas por inúmeros estudos, até agora, apenas três espécies bacterianas foram reconhecidas como verdadeiros agentes patogénicos periodontais - nomeadamente, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Tannerella forsythi* (Oliveira et al., 2016).

No entanto, desde então, o estudo da microbiota subgingival expandiu-se consideravelmente. A composição, complexidade, e a diversidade do microbioma oral foram estudados com maior profundidade e amplitude nos últimos anos. Estes avanços no conhecimento foram maioritariamente consequência do progresso tecnológico nos métodos moleculares, que permitiram uma análise aberta do microbioma local e/ou permitiu o estudo do segmento não cultivado da microbiota (Oliveira et al., 2016).

2.1 Alterações do Microbioma Subgingival

Os microrganismos vivem simbioticamente com os humanos e desempenham um papel importante na saúde e na doença. As alterações do microbioma contribuem para a patogénese de muitas doenças e refletem a saúde ou o estado da doença do hospedeiro. Assim, a monitorização das alterações no microbioma é uma nova aplicação potencialmente promissora no diagnóstico e prognóstico de doenças (Shi et al., 2015; Szafranski et al., 2015).

O microbioma subgengival, ou seja, a comunidade de microrganismos que habita o ambiente subgengival, tem sido objeto de investigação ao longo de várias décadas. A investigação compara a microbiota subgengival sob diferentes condições periodontais e tem sido conduzida utilizando várias técnicas. No entanto, as técnicas disponíveis na altura, não permitiam uma visão global da composição microbiana de uma determinada amostra, conjuntamente com a taxonomia de alta resolução e o processamento de amostras de alto rendimento (Diaz et al., 2016).

Embora alguns agentes patogénicos periodontais tenham sido detetados ocasionalmente e em baixos níveis em amostras de indivíduos cuja doença não foi diagnosticada, muitos dos organismos que têm estado recentemente implicados na doença só foram detetados em locais de inflamação. Os fatores que conduzem às alterações da microbiota na doença periodontal não são totalmente compreendidos. Uma série de teorias têm sido postuladas para explicar a alteração de uma relação simbiótica para uma relação disbiótica com o hospedeiro. Estas teorias variam desde infeções exógenas, coinfeção com vírus, proliferação de espécies menores dentro do biofilme, na sequência de alterações do ambiente local, até à baixa abundância de agentes patogénicos fundamentais que compõem espécies comensais para provocar uma resposta inflamatória destrutiva. No entanto, as evidências experimentais para provar estes conceitos são escassas (Naginyte et al., 2019).

Segundo Diaz et al. (2016), estudos revelaram uma grande proporção da diversidade microbiana subgengival e de dinâmicas da comunidade, sendo estes cruciais para o atual entendimento da etiopatologia da periodontite. Todos estes estudos, concordam que a doença periodontal está associada a alterações na composição da comunidade de microrganismos no sulco ou bolsa periodontal, em comparação com a saúde periodontal.

2.2 Complexos Microbianos Subgengivais

Socransky et al. (1998), que estudou o complexo bacteriano em placas subgengivais utilizando sondas de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico inteiro e hibridização *checkerboard* ADN-ADN, relata estudo que investiga a associação entre a comunidade bacteriana oral e a doença periodontal. Os resultados identificaram a presença de 40 taxa diferentes na placa subgengival e sugeriram que 3 espécies bacterianas, *Porphyromonas*

gingivalis, *Tannerella forsythia*, e *Treponema denticola*, são as principais bactérias periodontais patogênicas, que foram associadas como bactérias do complexo vermelho. As bactérias do complexo laranja, incluindo *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella nigrescens*, e *Prevotella intermedia*, são conhecidas como bactérias-ponte entre as estirpes de colonizadores precoces e as bactérias do complexo vermelho (Mehrotra & Singh, 2021; Park et al., 2015).

A periodontite é uma doença disbiótica resultante da variação subgengival, de bactérias gram-positivas para bactérias gram-negativas. O desenvolvimento da disbiose periodontal ocorre ao longo de um período alargado, o que lentamente transforma a associação simbiótica do hospedeiro, e do microrganismo para uma forma patogênica. Entre os complexos microbianos, o primeiro que tem sido relacionado com a doença é o complexo laranja, que consiste em espécies gram-negativas anaeróbicas, como *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella micros* e *Fusobacterium nucleatum*, que durante a progressão da doença altera-se para o complexo vermelho, que consiste em *Tannerella forsythia*, *Tannerella denticola* e *Porphyromonas gingivalis* (Kirst et al., 2015; Patini et al., 2018; Shaikh et al., 2018).

Segundo Mohanty et al. (2019), foram utilizadas técnicas de análise de agregados e ordenação comunitária de mais de 13.000 amostras de placa subgengival de 185 indivíduos adultos para demonstrar a presença de grupos microbianos específicos dentro da placa dentária. Foram reconhecidos seis grupos estritamente associados de espécies bacterianas que incluíam *Actinomyces*, um complexo amarelo constituído por membros do género *Streptococcus*, um complexo verde que consiste em espécies de *Capnocytophaga*, *A. actinomycetemcomitans* sorotipo *a*, *E. corrodens* e *Campylobacter* e um complexo roxo consistindo em *V. parvula* e *Actinomyces odontolyticus*. Estes grupos de espécies são os colonizadores primários da superfície do dente, cujo crescimento geralmente precede a multiplicação dos complexos laranja e vermelho, predominantemente gram-negativos.

O complexo laranja consiste em *Campylobacter gracilis*, *C. rectus*, *C. showae*, *E. nodatum*, subespécie *Fusobacterium nucleatum*, *F. periodonticum*, *Prevotella micros*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *S. constellatus*, enquanto o complexo vermelho consiste em *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* (Kirst et al., 2015). Estes dois complexos são constituídos pelas espécies consideradas os principais agentes etiológicos das doenças periodontais. As bactérias do complexo vermelho são conhecidas por aparecerem juntas nas amostras de placa, frequentemente adjacentes ao tecido epitelial da bolsa periodontal, em áreas mais profundas. Isto é principalmente devido à interação entre espécies, co-agregação e interdependência metabólica entre estas três espécies bacterianas (Nayak et al., 2018).

O complexo vermelho, que aparece posteriormente durante o desenvolvimento do biofilme, compreende espécies consideradas microrganismos periodontopatogénicos, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* (nomes anteriores *Bacteroides forsythus* ou *Tannerella forsythensis*). Este complexo apresenta uma parte da comunidade do *clímax* nos biofilmes em locais que expressam periodontite avançada (Jia et al., 2019; Mohanty et al., 2019).

Entre as bactérias do complexo vermelho, a quantidade de *Porphyromonas gingivalis* mostrou a associação mais forte com a severidade da condição periodontal, e a co-ocorrência de *Porphyromonas gingivalis* com *Treponema denticola* e/ou *Tannerella forsythia* mostrou uma progressão acentuada da periodontite (Mohanty et al., 2019).

Membros do complexo vermelho raramente são encontrados na ausência de membros do complexo laranja. Com o aumento da colonização pelo complexo laranja, mais locais são colonizados por um número crescente do complexo vermelho (Figura 3) (Mohanty et al., 2019).

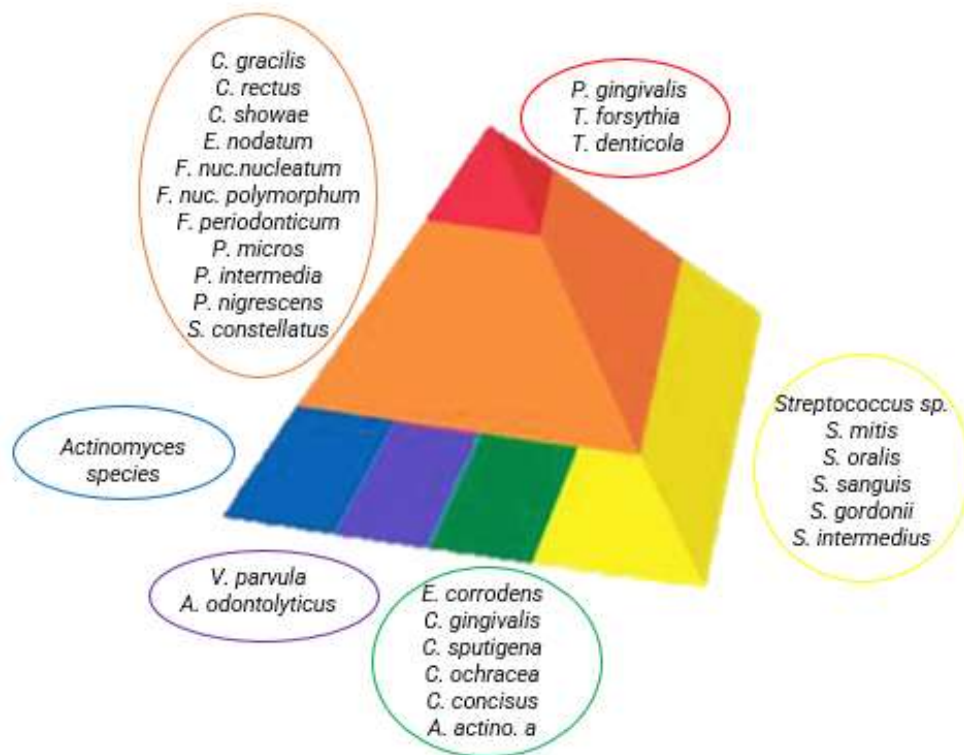


Figura 3 - Diferentes Complexos Microbianos Subgingivais

A base da pirâmide é constituída por espécies que colonizam a superfície do dente e proliferam numa fase inicial (Adaptado de Mohanty et al., 2019).

Porphyromonas gingivalis há muito que é considerada um membro importante da microbiota periodontopatogénica envolvida na progressão da doença periodontal e na destruição de osso e tecido. Darveau et al. 1997, classificou este anaeróbio pequeno, Gram-negativo e pigmentado de preto como um patógeno periodontal autêntico (Jia et al., 2019; Mohanty et al., 2019).

Interações entre *Porphyromonas gingivalis* e outros membros da microbiota oral, incluindo *Streptococcus spp.* e *Fusobacterium nucleatum* resultou numa co-agregação específica, o que contribui para a capacidade dos microrganismos colonizarem efetivamente os sulcos subgingivais. O evento inicial na patogenicidade de *Porphyromonas gingivalis* é a sua interação (adesão) na cavidade oral. Para conseguir isso, *Porphyromonas gingivalis* emprega vários componentes bacterianos: fimbrias, proteases, hemaglutininas e lipopolissacarídeos (Mohanty et al, 2019).

2.3 Dinâmicas da Comunidade em Doenças Periodontais

Existe um equilíbrio dinâmico entre o hospedeiro e a microbiota oral, e alterações substanciais no ambiente local podem conduzir a mudanças prejudiciais na composição microbiana dos biofilmes dentários, e estas alterações podem predispor um local de doença (disbiose). Por exemplo, a ingestão frequente de açúcares fermentáveis e/ou reduções no ciclo salivar podem resultar em biofilmes dentários com períodos prolongados de pH baixo. Isto proporciona espécies acidogénicas/ácido-tolerantes em detrimento de bactérias orais benéficas que crescem preferencialmente em pH neutro, aumentando assim o risco de cáries dentárias (Lamont et al., 2018; Naginyte et al., 2019).

Em contraste, a gengivite e a periodontite estão associadas a uma resposta inflamatória ao excesso de acumulação de biofilme em torno da margem gengival. Esta resposta pode ser desregulada e subvertida por algumas populações bacterianas levando a um aumento da expressão de moléculas pró-inflamatórias, e a um aumento do fluxo de fluido crevicular gengival (FCG; um exsudado sérico rico em proteínas) (Naginyte et al., 2019).

As análises metatranscriptómicas do microbioma subgengival sugerem que a comunidade microbiana se adapta às condições nutricionais e ambientais em mutação no sulco gengival. Como a biomassa aumenta com as doenças, provavelmente devido a uma maior disponibilidade de fontes de carbono originárias do fluido crevicular gengival, espera-se que a competição pelos recursos mais escassos se torne feroz e as espécies que sejam capazes de se adaptar e capturar os nutrientes limitantes sejam as que acabam por prosperar (Duran-Pinedo et al., 2014). Por conseguinte, os estudos metatranscriptómicos salientam a natureza ecológica das mudanças microbiológicas e a importância de compreender a adaptação da comunidade às pressões ambientais (Diaz et al., 2016).

A discussão sobre nutrição e doença periodontal é mais complexa. Não há modificações simples de ingestão de micronutrientes ou macronutrientes que previnam ou detenham totalmente a doença periodontal. Além disso, a doença periodontal não é apenas influenciada pela má nutrição (quer micro ou macronutrientes), mas também por outros fatores como a higiene oral, o tabagismo e a genética (Hujoel & Lingström, 2017).

3. Métodos de Análise do Microbioma Subgengival

Atualmente o desenvolvimento de novas tecnologias moleculares têm proporcionado um avanço no estudo do microbioma subgengival. A descoberta de novos microrganismos periodontopatogénicos permite identificar e caracterizá-los num contexto complexo.

De seguida, são abordados os diferentes métodos de análise do microbioma subgengival. Estes métodos permitem obter milhões de fragmentos dos genes através da sequenciação duma única amostra de ADN, o que revolucionou a investigação microbiana.

3.1 Gene marcador 16S Ácido Ribonucleico Ribossomal (ARNr)

O mundo microbiano foi revolucionado em 1977 quando *Carl Woese* demonstrou que o gene 16S ARN ribossomal podia ser usado para traçar as relações evolutivas entre bactérias. Entre as revelações da descoberta estava que a *Archaea*, anteriormente considerada como um curioso subgrupo de bactérias restrito a ambientes extremos, era na realidade um domínio evolutivamente distinto da vida. O uso subsequente de biomarcadores do gene ribossómico conservado expandiu-se para além do mundo microbiano para sequenciar e organizar toda a vida na Terra, e revelou que as bactérias podem ser tão diferentes umas das outras, como as leveduras unicelulares são dos humanos (Greene & Reid, 2013; Woese, & Fox, 1977).

Um marcador é uma sequência de ADN que identifica o genoma que o contém, sem necessidade de sequenciar todo o genoma. Embora diferentes marcadores possam ser escolhidos para analisar diferentes populações, várias propriedades são desejáveis para um bom marcador. Um marcador deve estar presente em cada membro de uma população, deve diferir apenas e sempre entre indivíduos com genomas distintos, e, idealmente, deve diferir proporcionalmente à distância evolutiva entre genomas distintos (Morgan & Huttenhower, 2012).

Vários desses marcadores foram definidos, incluindo subunidades de proteína ribossómica, fatores de alongamento e subunidades de ARN polimerase, mas de longe o mais omnipresente (e historicamente significativo) é o gene pequeno ou 16S da subunidade ARN ribossómica. Este gene de 1,5 Kbp é geralmente referido como 16S

ARNr (após a transcrição) ou às vezes rADN; satisfaz os critérios de um marcador ao conter tanto sequências altamente conservadas e omnipresentes, como regiões que variam com maior ou menor frequência ao longo do tempo de evolução (Morgan & Huttenhower, 2012).

O estudo e caracterização das comunidades bacterianas pela sequenciação de genes de manutenção, como o que codifica a pequena subunidade do ARN ribossomal revelou a extensa diversidade da vida bacteriana na Terra (Wade & Prosdocimi, 2020).

Os estudos utilizam frequentemente pesquisas do gene marcador 16S ARNr (sequenciação direcionada do gene 16S ARNr) para caracterizar as comunidades microbianas (Olson et al., 2020).

O processo de medição de pesquisas de genes marcadores do 16S ARNr inclui etapas moleculares para seletivamente direcionar e sequenciar o gene 16S ARNr, e etapas de análise informática para converter os dados da sequência “bruta” numa tabela de valores de abundância relativa de características (Olson et al., 2020).

Os dados da sequência do gene marcador microbiano podem ser utilizados para gerar perfis taxonômicos abrangentes dos microrganismos presentes numa dada comunidade e para outras análises da diversidade comunitária. O processo de passar de sequências de genes em “bruto” para perfis taxonômicos ou medidas de diversidade envolve uma série de transformações de dados realizadas por diversas técnicas e instrumentos informáticos. Isto inclui ferramentas para verificação da qualidade da sequência, *denoising*, classificação taxonômica, alinhamento, e construção filogenética de árvores (Hall & Beiko, 2018).

A caracterização da comunidade bacteriana oral por amplificação e sequenciação direcionada do gene 16S ARN ribossomal está agora bem estabelecida e tem sido utilizada como a base para *Human Oral Microbiome Database* (HOMD) (Wade & Prosdocimi, 2020).

A utilização de métodos de sequenciação de próxima geração levou a uma mudança radical nos números de leituras sequenciais de gêneros, fornecendo à análise uma profundidade de cobertura muito melhorada. Estes métodos permitiram catalogar

exaustivamente a diversidade de bactérias e arqueobactérias encontradas na cavidade oral e as associações feitas entre taxas específicas e estados de saúde e doença (Wade & Prosdocimi, 2020).

3.1.1 Sequenciação do Gene 16S ARNr: Uma Nova Era na Microbiologia Periodontal

O desenvolvimento da sequenciação do gene 16S ARNr abriu uma nova era na microbiologia periodontal ao permitir uma visão global das espécies bacterianas numa amostra, mas não foi até ao advento de métodos de sequenciação de alto rendimento que a técnica se tornou o novo *gold standard* (Diaz et al., 2016).

A macromolécula 16S é a mais utilizada em filogenia microbiana e taxonomia. Através da sequenciação, a bactéria pode ser inequivocamente identificada; ao sequenciar todos os genes 16S numa população, é possível descrever o local ecológico e o número de cada um dos seus componentes (López -Martínez et al., 2020).

Os ARNrs são componentes essenciais da maquinaria de síntese de proteínas em todas as células e, por conseguinte, as suas sequências genéticas têm regiões (semelhantes) altamente conservadas entre as espécies (Figura 4). Estas regiões são utilizadas para conceber iniciadores *polymerase chain reaction* (PCR) universais, capazes de reconhecer segmentos da sequência genética 16S ARNr da grande maioria, senão de todas, as espécies bacterianas.

Para além das regiões conservadas, existem também várias regiões hipervariáveis (diferentes entre espécies) ao longo dos 1500 pares de bases que formam o gene 16S ARNr, que podem ser usadas como assinaturas para distinguir uma espécie da outra.

Assim, a sequência do gene 16S ARNr tornou-se o procedimento de eleição para determinar a composição global da comunidade bacteriana numa determinada amostra de placa bacteriana (Diaz et al., 2016).

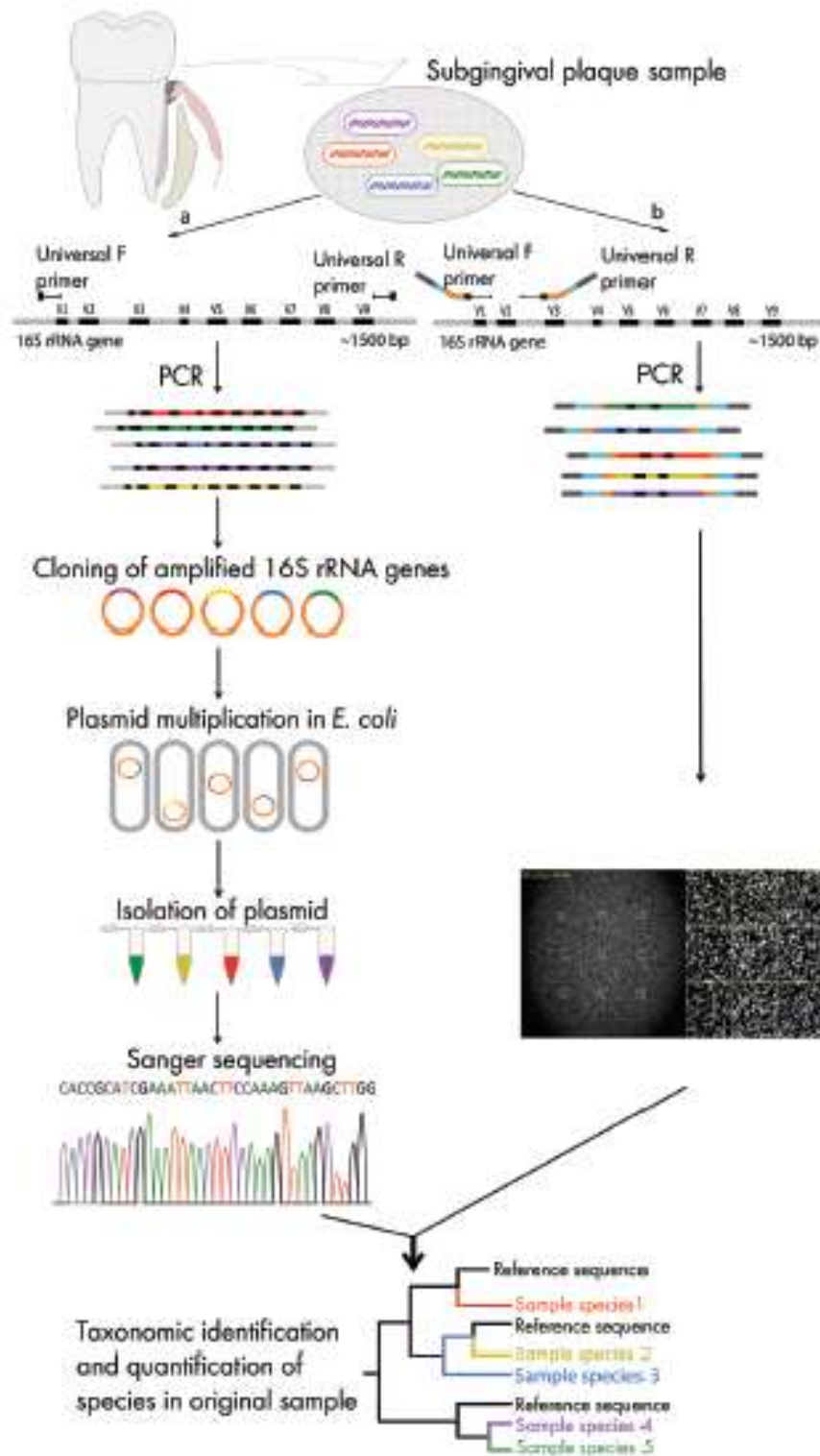


Figura 4- Fases para caracterização do Microbioma Subgingival através do sequenciamento do gene 16S ARNr.

Os diferentes genes 16S ARNr foram amplificados através de PCR com *primers* universais. Os *amplicons* do gene 16S ARNr foram subsequentemente clonados e multiplicados em *Escherichia coli* (Diaz et al, 2016).

Segundo Diaz et al. (2016), a obtenção das sequências do gene 16S ARNr de uma comunidade bacteriana contendo múltiplas espécies foi inicialmente um processo laborioso, pois envolveu a clonagem de *amplicons* do gene 16S ARNr em vetores de plasmídeo com posterior replicação *em Escherichia coli* para obter uma preparação pura de cada molécula amplificada de 16S ARNr. Depois de amplificado, clonado e purificado, cada tipo de gene 16S ARNr foi então sequenciado pelos métodos *Sanger* e a sua sequência comparada com uma base de dados de sequências de genes 16S ARNr, para encontrar uma espécie ou parente mais próximo (Figura 4).

A sequenciação do gene 16S ARNr não se teria tornado o método de eleição para a caracterização da microbiota oral, se não fosse a existência de bases de dados de referência tais como a *Human Oral Microbiome Database (HOMD)*, que permite a classificação da maioria das sequências num conjunto de dados por níveis de espécies. Como resultado, o processo de avaliação das comunidades subgengivais através da sequência genética 16S ARNr de alto rendimento tornou-se preciso, economicamente viável e acessível à maioria dos investigadores (Diaz et al., 2016; Fukuda et al., 2016).

3.1.1.1 Microbioma Subgengival em Saúde e na Periodontite pela Sequenciação do Gene 16S ARNr

Os estudos sobre a comunidade microbiana subgengival identificaram uma ligação entre a composição taxonómica e a patogénese da doença. O estudo clássico de *Socransky et al.* (1998), revelou que a doença pode estar associada a determinados organismos bacterianos, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, e *Tannerella forsythia*, que foram classificados como organismos do complexo vermelho. Estudos recentes, através da análise de sequenciação de genes 16S ARNr, proporcionaram uma visão mais abrangente da comunidade subgengival na saúde e na doença. Através da análise de amostras combinadas, de diferentes localizações de dentes e/ou indivíduos, vários estudos caso-controlo revelaram diferenças distintas na composição taxonómica para estados saudáveis e doentes (Shi et al., 2015).

Apesar da composição taxonómica da comunidade subgengival já ter sido caracterizada, o potencial funcional codificado no microbioma, continua em grande parte por ser caracterizado (Shi et al., 2015).

A comparação de amostras retiradas de doentes com periodontite com as de indivíduos saudáveis, revelaram associações entre a doença e várias vias metabólicas e fatores de virulência. No entanto, continua por investigar se os perfis funcionais do microbioma subgengival são diferentes em estados de saúde e doença. Além disso, não é claro se as diferenças no perfil funcional são o reflexo da progressão da doença e podem servir como marcadores no diagnóstico e prognóstico da doença (Shi et al., 2015; Szafranski et al., 2015).

Segundo Diaz et al. (2016), as alterações reportadas concordam com estudos de sequenciação do gene pré-16S ARNr, que mostram uma tendência para níveis mais elevados de microrganismos Gram-negativos na periodontite e uma clara associação das espécies do complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) com a doença. Além disso, estudos de sequenciação de alto rendimento confirmaram, conforme observação prévia através da cultura, que a periodontite está associada a um aumento na abundância relativa de uma ampla gama de táxons, a maior parte dos quais permanecem sob estudo do ponto de vista biológico.

Na figura 5, encontram-se os dados de quatro estudos de sequenciação de alto rendimento. Este estudo demonstra as espécies associadas à saúde e à periodontite presentes no microbioma subgengival, ou seja, as espécies que aumentam ou diminuem em abundância relativa de acordo com o estado clínico. A maioria dos estudos geralmente deteta mais espécies associadas à periodontite do que à saúde, pois as comunidades periodontais são mais diversas devido a uma distribuição mais equilibrada, em termos de percentagens, das espécies que formam a comunidade. É evidente a partir da figura 5 que as comunidades associadas à saúde e periodontite são entidades complexas e que o conhecimento desta doença requer um estudo profundo de cada membro da comunidade e da sua interação com outras espécies e com o hospedeiro (Diaz et al., 2016).

Health-associated species

*Abiotrophia defectiva*¹
Acidovorax sp. 98-63833¹
*Acinetobacter junii*¹
Actinobaculum sp. HOT183¹
*Actinomyces massiliensis*¹
*Actinomyces naeslundii*²
*Actinomyces odontolyticus*¹
Actinomyces sp. HOT169²
Actinomyces sp. HOT170²
Actinomyces sp. HOT171³
Actinomyces sp. HOT175²
Actinomyces sp. HOT177¹
Actinomyces sp. HOT180¹
*Arthrobacter woluwensis*¹
Bergeyella sp. HOT322¹
*Brachybacterium rhamnosum*¹
*Burkholderia cepacia*²
*Capnocytophaga gingivalis*²
*Capnocytophaga leadbetteri*¹
*Capnocytophaga sputigena*¹

Comamonadaceae nbu379c11c1¹
 Comamonadaceae VE2A04¹
*Corynebacterium durum*²
Corynebacterium matruchoti^{2 (1=46)}
Eikenella corrodens^{1 (1=46)}
Fusobacterium nucleatum ss *polymorphum*^{2 (1=46)}
*Gemella haemolysans*²
*Gemella morbillorum*²
Granulicatella adiacens^{2 (1=46)}
*Haemophilus P3D1_620*¹
*Haemophilus parahaemolyticus*¹
Haemophilus parainfluenzae^{1 (1=46)}
*Kingella orafis*¹
*Lautropia AP009*¹
Lautropia mirabilis^{2 (1=46)}
Leptotrichia sp. HOT212¹
Leptotrichia sp. HOT225¹
*Maraxella osloensis*¹
*Neisseria elongata*¹
*Porphyromonas catoniae*²

Porphyromonas sp. HOT279²
*Propionibacterium propionicum*¹
Rothia dentocariosa^{2 (1=46)}
Schwartzia sp. HOT155^{1 (1=46)}
*Selenomonas naxia*¹
Selenomonas sp. HOT138¹
*Streptococcus B66*¹
*Streptococcus cristatus*¹
*Streptococcus gordanii*¹
*Streptococcus intermedius*²
Streptococcus mitis bv2¹
Streptococcus mitis^{2 (1=46)}
*Streptococcus sanguinis*²
Streptococcus sp. HOT058¹
Streptococcus sp. HOT064¹
*Streptococcus vestibularis*¹
 unclassified Xanthomonadaceae¹
Veillonella parvula^{2 (1=46)}

Core species

*Campylobacter gracilis*²
*Calonella morbi*¹
Corynebacterium matruchoti^{1 (1=46)}
Eikenella corrodens^{1 (1=46)}
Fusobacterium nucleatum ss *animalis*^{1 (1=46)}

Fusobacterium nucleatum ss *nucleatum*¹
Fusobacterium nucleatum ss *vincentii*^{2 (1=46)}
Granulicatella adiacens^{1 (1=46)}
Haemophilus parainfluenzae^{1 (1=46)}
Lautropia mirabilis^{1 (1=46)}

*Prevotella nigrescens*¹
Prevotella sp. HOT317¹
*Pseudomonas pseudoalcaligenes*¹
Streptococcus mitis^{1 (1=46)}
Veillonella parvula^{1 (1=46)}

Periodontitis-associated species

Aggregatibacter sp. HOT458¹
*Anaeroglobus geminatus*²
Anaerolineae [G-1] sp. HOT439²
*Atopobium rimae*¹
Bacteroidaceae [G-1] sp. HOT272²
Bacteroidales [G-2] sp. HOT274²
Bacteroidetes [G-3] sp. HOT280¹
Bacteroidetes [G-6] sp. HOTS16¹
*Bifidobacterium dentium*¹
*Campylobacter rectus*¹
Clostridiales [F-1][G-1] sp. HOT093¹
Desulfobulbus sp. HOT041¹
*Dialister invisus*¹
*Enterobacter cancerogenus*¹
*Eubacterium brachy*²
*Eubacterium minutum*¹
*Eubacterium nodatum*²
*Eubacterium saphenum*²
*Eubacterium yurii*¹
*Filifactor aloicis*⁴
*Fretibacterium fastidiosum*²
Fretibacterium sp. HOT360⁴
Fretibacterium sp. HOT361²
Fretibacterium sp. HOT362¹
*Fusobacterium A71*¹
Fusobacterium nucleatum ss *animalis*^{1 (1=46)}
Fusobacterium nucleatum ss *polymorphum*^{1 (1=46)}
Fusobacterium nucleatum ss *vincentii*^{1 (1=46)}
Fusobacterium sp. HOT203¹
Johnsonella sp. HOT166¹

Lachnospiraceae [G-8] sp. HOTS00²
*Leptotrichia EX103*¹
*Leptotrichia JK040*¹
Leptotrichia sp. HOT215¹
Leptotrichiaceae [G-1] sp. HOT210¹
*Mogibacterium timidum*²
*Mycoplasma faucium*¹
*Parvimonas micra*²
Peptostreptococcaceae [11][G-2] sp. HOT091¹
Peptostreptococcaceae [11][G-4] sp. HOT369¹
Peptostreptococcaceae [13][G-1] sp. HOT113¹
*Peptostreptococcus stomatis*²
*Porphyromonas endodontalis*⁴
*Porphyromonas gingivalis*⁴
*Prevotella buccae*¹
*Prevotella denticola*²
*Prevotella intermedia*²
*Prevotella melaninogenica*¹
*Prevotella oralis*¹
*Prevotella oris*¹
*Prevotella outorum*¹
Prevotella sp. HOT292¹
Prevotella sp. HOT526¹
*Prevotella tanneriae*²
*Pseudoramibacter alactolyticus*²
Rothia dentocariosa^{1 (1=46)}
Schwartzia sp. HOT129¹
Schwartzia sp. HOT132¹
Schwartzia sp. HOT145²
Schwartzia sp. HOT150¹

Schwartzia sp. HOT155^{1 (1=46)}
*Selenomonas diana*²
Selenomonas sp. HOT126¹
*Selenomonas sputigena*²
*Shuttleworthia CT1*¹
*Solobacterium moorei*¹
Stomatobaculum sp. HOT373¹
*Streptococcus anginosus*¹
*Streptococcus constellatus*²
*Streptococcus parasanguinis_II*¹
*Synergistes G36*¹
*Tannerella forsythia*⁴
TM7 [G-1] sp. HOT346²
TM7 [G-1] sp. HOT349¹
TM7 [G-5] sp. HOT356²
TM7 [G-5] sp. HOT437¹
*Treponema amylovorum*¹
*Treponema denticola*⁴
*Treponema lecithinolyticum*²
*Treponema maltophilum*¹
*Treponema medium*²
*Treponema sacranskii*⁴
Treponema sp. HOT230¹
Treponema sp. HOT237²
Treponema sp. HOT246¹
Treponema sp. HOT257¹
Treponema sp. HOT490¹
 unclassified Clostridiales¹

Figura 5- Espécies do Microbioma Subgingival associadas à Saúde e à Periodontite

A forma cinzenta mostra as espécies centrais, que não mudaram em abundância relativa da Saúde para Periodontite (Diaz et al., 2016).

As espécies centrais estão vinculadas a ser metabolicamente versáteis, pois são capazes de prosperar sob as condições nutricionais e ambientais presentes tanto na saúde como na periodontite. Mais importante, as espécies centrais são provavelmente capazes de interações sinérgicas com espécies associadas à saúde e à doença, à medida que crescem com sucesso em ambos os grupos. Além disso, são capazes de crescer bem sob vários tipos de arranjos comunitários, pois são muito prevalentes apesar das variações na composição da comunidade de sujeito para sujeito. Devido a esta versatilidade, Diaz et al. 2016, colocou a hipótese de que as espécies centrais atuam como pedras angulares metabólicas para toda a comunidade, e que a sua presença é provavelmente importante nas mudanças microbiológicas da saúde para periodontite.

A espécie central mais abundante em ambos os estudos foi *Fusobacterium nucleatum*, um Gram-negativo anaeróbio com capacidade demonstrada para interagir fisicamente através da co-agregação com uma gama diversificada de espécies orais. *Fusobacterium nucleatum* também tem demonstrado apoiar metabolicamente o crescimento de taxa associada à periodontite em várias investigações *in vitro*. Numa comunidade polimicrobiana ativa de cultura contínua, *Fusobacterium nucleatum* teve uma influência positiva na biomassa dos anaeróbios Gram-negativos *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella nigrescens*. Além disso, *Fusobacterium nucleatum* pode facilmente adaptar-se a condições ativas, metabolizando oxigénio através de atividades enzimáticas como as da NADH oxidase, reduzindo assim o ambiente a níveis anaeróbicos em que *Porphyromonas gingivalis* pode prosperar. *Fusobacterium nucleatum* também gera CO₂, que é subsequentemente metabolizado por *Porphyromonas gingivalis*. O desenvolvimento de estratégias dirigidas para controlar a maturação da placa subgingival, pode beneficiar ao concentrar-se nas interações interespecies, envolvendo membros centrais, uma vez que podem ter um papel essencial de facilitar as sucessões microbianas (Diaz et al., 2016; Hong et al., 2015).

Para uma melhor compreensão da alteração do microbioma da saúde para a periodontite, é necessário considerar não apenas as alterações nas proporções das espécies, mas também alterações na biomassa. Técnicas tais como a sequenciação do gene 16S ARNr apenas podem revelar mudanças nas proporções relativas das espécies, mas não medem as mudanças na biomassa de taxa específica (Diaz et al., 2016).

3.1.2 Sequências em UTOs

Um desafio bioinformático que surge imediatamente na análise dos genes de ARNr é a definição precisa de uma sequência "única". Embora grande parte do gene 16S ARNr esteja altamente conservado, várias das regiões sequenciadas são variáveis ou hipervariáveis, de modo que pequenos números de pares de base possam mudar num período muito curto de tempo evolutivo (Callahan et., 2017; Morgan & Huttenhower, 2012; Nguyen et al., 2016).

Finalmente, porque as regiões 16S são tipicamente sequenciadas utilizando apenas uma única passagem, há assim uma provável hipótese de conterem pelo menos um erro de sequenciação. Isto significa que exigir que as etiquetas sejam 100% idênticas será extremamente conservador e tratará os genomas clonais como organismos diferentes. É normalmente permitido algum grau de divergência de sequência. Percentagens de 95%, 97%, ou 99% são cortes de semelhança de sequência frequentemente utilizados na prática, e o conjunto resultante de etiquetas quase idênticas (e, portanto, assumidamente genomas idênticos) é referido como uma Unidade Taxonômica Operacional (UTOs) ou, por vezes, como um filotipo (Callahan et., 2017; Morgan & Huttenhower, 2012; Nguyen et al., 2016).

As UTOs tomam o lugar de "espécies" em muitas análises de diversidade microbiológica porque os genomas de espécies nomeadas não estão muitas vezes disponíveis para determinadas sequências de marcadores. A atribuição de sequências às UTOs é referida como *binning*, e pode ser executado por: a) agrupamento, sem supervisão, de sequências semelhantes; b) modelos filogenéticos incorporando taxas de mutação e relações evolutivas, ou c) métodos supervisionados que atribuem diretamente sequências a compartimentos taxonômicos com origem em bases de dados etiquetados (Callahan et., 2017; Morgan & Huttenhower, 2012; Nguyen et al., 2016).

O processo de *binning* permite que uma comunidade seja analisada em termos de compartimentos discretos ou UTOs, abrindo uma gama de representações informaticamente rastreáveis para análise biológica. Se cada UTO for tratada como uma categoria distinta, ou cada sequência 16S for colocada num filo nomeado ou outra

categoria taxonômica, um conjunto de sequências microbiológicas pode ser representado como um histograma de contagem de compartimentos (Nguyen et al., 2016).

Alternativamente, este histograma pode ser binarizado em chamadas de presença/ausência para cada compartimento através de uma coleção de amostras relacionadas. Uma vez que as UTOs, diversas e gerais, estarão sempre presentes em comunidades relacionadas, e as UTOs demasiado específicas podem não aparecer fora da sua amostra de origem, esta última abordagem é tipicamente mais útil para microbiomas de baixa complexidade ou UTOs a um nível de especificidade devidamente apropriado. Os bioinformáticos que estudam sequências 16S, devem escolher se querem analisar uma coleção de microbiomas categorizados taxonomicamente como um conjunto de histogramas de abundância, ou, como um conjunto de vetores de presença/ausência binários (Callahan et., 2017; Morgan & Huttenhower, 2012; Nguyen et al., 2016).

O ponto de partida para uma análise mais aprofundada é uma tabela que mostra os números de cada UTO por amostra. Esta poderá ter centenas de linhas (dependendo da dimensão do estudo) e milhares de colunas (em função dos parâmetros de agrupamento escolhidos). O objetivo mais comum de um estudo microbiológico é determinar se o microbioma em 2 grupos de amostras difere significativamente. O microbioma de uma amostra é representado pela abundância relativa de todas as UTOs individuais (ou seja, todas as colunas da tabela), sendo cada uma delas uma única variável. Este objetivo só pode ser alcançado através de uma análise estatística multivariada, capaz de ter em conta muitas variáveis diferentes ao mesmo tempo (Wade & Prosdocimi, 2020).

A distribuição do número de sequências de uma dada UTO nas amostras não é normal, e em especial para as UTOs raras, pode conter muitos zeros. Para obter uma lista das espécies da amostra, é possível obter uma identificação consensual das sequências dentro de cada UTO (Wade & Prosdocimi, 2020).

As UTOs incluem frequentemente múltiplas espécies, e as espécies podem ser encontradas em múltiplas UTOs. Por este motivo, e devido à incapacidade das sequências parciais do gene 16S ARNr ao nível das espécies, muitos autores classificam as UTOs apenas para o género. Uma alternativa é realizar uma análise paralela de filótipos, em que

cada sequência única é comparada com a base de dados (Callahan et., 2017; Wade & Prosdocimi, 2020).

A organização espacial da microbiota da placa subgengival é fundamental para compreender a ecologia, fisiologia e características funcionais da comunidade. Foram identificados os dez UTOs mais abundantes em cada grupo, dos quais 6 UTOs eram idênticos. *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, ambos com propriedades de virulência significativa, foram as UTOs dominantes em ambos os grupos (Liu et al., 2020).

3.2 Sequenciação metagenômica *Shotgun*

A sequenciação do ADN ambiental revelou a biodiversidade alargada de microrganismos e clarificou a relação entre as comunidades microbianas associadas ao hospedeiro e o fenótipo do hospedeiro. A sequenciação metagenômica do ADN de *Shotgun* é uma abordagem relativamente nova e poderosa de sequenciação ambiental que fornece uma visão da biodiversidade e função da comunidade. Mas, a análise das sequências metagenômicas é complicada devido à estrutura complexa dos dados (Schlaberg et al., 2017; Sharpton, 2014).

A sequenciação metagenômica *Shotgun* é uma abordagem alternativa ao estudo da microbiota não cultivada que evita estas limitações. Aqui, o ADN é novamente extraído de todas as células de uma comunidade. Mas, em vez de se selecionar um local genómico específico para amplificação, todo o ADN é subsequentemente quebrado em pequenos fragmentos que são sequenciados de forma independentemente. Isto resulta em sequências de ADN (ou seja, leituras) que se alinham com vários locais genómicos para a miríade de genomas presentes na amostra, incluindo os não microrganismos. Algumas destas leituras serão amostradas a partir de *loci* genómicos taxonomicamente informativos (por exemplo, 16S), e outras serão amostradas a partir de sequências de codificação que fornecem conhecimento sobre as funções biológicas codificadas no genoma (Sharpton, 2014; Ranjon et al., 2016).

Embora as medidas de diversidade comunitária tenham dominado as análises históricas, estão a ser desenvolvidos métodos modernos de alto rendimento para uma série de outros ensaios "meta" a partir de microrganismos não cultivados (Morgan & Huttenhower, 2012).

Recentemente, o avanço das tecnologias "Ómicas" tem permitido uma abordagem mais holística da avaliação da microbiota oral do hospedeiro. Mais especificamente, é apenas com o advento de uma cultura livre, de tecnologias de sequenciação de alto rendimento, tais como 16S ARNr e sequenciação metagenómica *shotgun*, que agora podemos caracterizar e comparar de forma abrangente os constituintes das comunidades bacterianas com uma resolução sem precedentes. A recente adoção generalizada de tecnologias de sequenciação de próxima geração (NGS) conduziu a conjuntos de dados metagenómicos ainda mais massivos, embora curtos (Ai et al., 2017; Boutin et al., 2017).

Segundo estudos de Abusleme et al. (2014) e Wang et al. (2013), com base em 16S ARNr e sequenciação por *shotgun*, confirmaram diferenças significativas nas estruturas das comunidades microbianas entre indivíduos saudáveis e periodontalmente comprometidos. Orth et al. (2011), utilizou uma combinação de métodos baseados na cultura e sequenciação de alto rendimento para identificar um agente patogénico chave, *Porphyromonas gingivalis*, que, embora prevalente em amostras subgengivais, pode influenciar a resposta imunitária do hospedeiro para promover as bactérias que causam a periodontite (Ai et al., 2017).

3.2.1 Alterações na Função da Comunidade da Saúde para a Periodontite via Metatranscriptómica

As comunidades subgengivais podem também ser caracterizadas através da sequenciação de *Shotgun* ADN, que proporciona uma visão global de todos os genes ou via sequenciação de ARN, que revela todas as transcrições de ARN numa dada comunidade. O estudo metatranscriptómico (sequenciação de todas as transcrições de ARN numa comunidade), permite a avaliação da composição da comunidade baseada apenas em taxa que são metabolicamente ativas. Também permite a análise de alterações nas atividades metabólicas de espécies específicas ou alterações metabólicas na comunidade como um todo (Diaz et al., 2016).

A metatranscriptomia tem sido utilizada para comparar o microbioma subgingival na saúde e periodontite. As comunidades de periodontite têm aumentado os processos biológicos relacionados com a motilidade flagelar, transporte de peptídeos, aquisição de ferro, degradação de beta-lactamases, biossíntese de lipídio A e respostas celulares ao stress. A superexpressão destes processos na periodontite não ocorreram apenas nas espécies associadas à periodontite, mas também as espécies centrais associadas à saúde contribuíram para o aumento destas funções, em concordância com o conceito de que toda a comunidade responde como um todo às alterações das condições ambientais que acompanham a formação de bolsas (Diaz et al., 2016).

Uma das funções mais amplamente reguladas entre as espécies durante a periodontite é a aquisição de ferro, sugerindo que a capacidade para competir por este nutriente pode ser determinante para as espécies que são ultimamente capazes de prosperar à medida que se acumula a biomassa. Outra função amplamente regulada na periodontite foi a resposta ao stress oxidativo, o qual pode ser uma consequência do aumento de neutrófilos presentes na doença, uma vez que estas células utilizam a geração de radicais de oxigénio como um mecanismo de morte celular. Em alternativa, o aumento do stress oxidativo pode também resultar numa maior abundância de bolsas periodontais com espécies ricas em proteinase com a subsequente degradação de proteínas séricas contendo ferro, tais como a transferrina (Diaz et al., 2016).

As proteinases estimulam o crescimento bacteriano através da libertação de peptídeos e ferro, mas também têm demonstrado contribuir para geração de radicais de oxigénio ao visar proteínas que contêm ferro (Naginyte et al., 2019).

Estudos têm demonstrado que o microbioma nas bolsas periodontais é marcadamente diferente do encontrado na saúde, e contém elevadas proporções de anaeróbios obrigatórios, frequentemente taxa proteolítica, algumas das quais ainda não foram cultivadas em laboratório, e outras não foram ainda identificadas (Naginyte et al., 2019).

3.3 Sequenciação de Próxima Geração

O perfil da comunidade bacteriana com base na sequenciação de próxima geração do gene 16S ARNr é atualmente o procedimento padrão para determinar a composição de comunidades bacterianas complexas. Os custos de sequenciação estão sempre a diminuir, e o surgimento de tecnologias de leitura prolongada irá transformar os métodos metagenômicos *shotgun* e permitir que as comunidades sejam perfiladas a uma profundidade equivalente à agora possível com métodos baseados em *amplicons* (Statko et al., 2018; Van dijk et al., 2018).

Determinar a composição de dados metagenômicos, no entanto, depende da comparação com sequências de base de dados. A acentuada variabilidade da composição do genoma entre estirpes da mesma espécie significa que, para que as comparações de fragmentos do genoma inteiro sejam precisas, é necessário que esteja disponível um número suficiente de genomas de referência para cada espécie (Schrieler et al., 2018).

A sequenciação de próxima geração (NGS) representa uma série de diferentes tecnologias de sequenciação atuais após a sequenciação da primeira geração, conhecida como sequenciação Sanger. Na última década, várias plataformas NGS forneceram sequenciação de baixo custo e de alto rendimento. As plataformas NGS, incluindo 454 GS FLX (Roche), HiSeq/MiSeq (Illumina), SOLiD (Applied Biosystems), e Ion PGM (Ion Torrent), possuem a capacidade de sequenciar milhões de fragmentos de ADN em poucos dias (Statko et al., 2018; Van dijk et al., 2018).

O processo de amplificação do gene 16S ARNr utilizando iniciadores universais é necessário tanto para o NGS como para a Biblioteca de clones de ADN. As análises NGS, no entanto, são surpreendentemente diferentes do método de biblioteca de clones nos dois pontos seguintes. Em primeiro, os métodos NGS não requerem a construção de uma biblioteca de clones usando *Escherichia coli*. Em segundo, o número de sequências lidas numa só análise, utilizando a plataforma, é consideravelmente maior do que no método de sequenciação habitual de Sanger (Statko et al., 2018).

As tecnologias NGS, especialmente as plataformas 454 GS FLX e Illumina, têm sido comumente utilizadas para estudos da comunidade bacteriana. No procedimento da plataforma 454 GS FLX, cada *amplicon* PCR (16S ARNr genes) que tem adaptadores

específicos em ambas as extremidades são fixadas individualmente a um microfilme, posteriormente os fragmentos de ADN são amplificados. De seguida, os grânulos resultantes, cada um dos quais contém muitas cópias clonadas do mesmo fragmento de ADN, são colocados num micropoço (~29 µm diâmetro). Os poços são também preenchidos com uma mistura de reação sequenciada. Esta plataforma emprega uma química de pirosequência, que utiliza pirofosfato libertado durante uma reação de polimerase (Schlaberg et al., 2017; Statko et al., 2018).

As plataformas *Illumina HiSeq* e *MiSeq* são as mais amplamente utilizadas para estudos da comunidade microbiana. Na tecnologia de sequenciação das plataformas *Illumina*, fragmentos de ADN, com adaptadores específicos adicionados em ambas as extremidades hibridizam a oligonucleótidos. Cada fragmento é amplificado para fazer um aglomerado de fragmentos idênticos (Statko et al., 2018; Van dijk et al., 2018).

3.4 Hibridação ADN - ADN *checkerboard*

Outra inovação que pode ser utilizada para classificar rapidamente através de muitas amostras e muitas espécies de bactérias é uma tecnologia chamada *checkerboard hybridization* (Figura 6) (Wilson et al., 2018).

Socransky et al. (1998), descreveu a técnica de diagnóstico microbiológico, hibridação ADN-ADN *checkerboard*, que utiliza sondas de ADN para o diagnóstico microbiológico, em que analisam as associações entre 40 espécies bacterianas presentes no microbioma subgingival de indivíduos com periodontite.

As técnicas de identificação molecular em novos formatos de sonda-alvo, como a hibridização ADN - ADN *checkerboard*, permitem a enumeração de um grande número de espécies em um grande número de amostras (Socransky et al., 2004).

As sondas de ADN usadas no formato *checkerboard* ADN – ADN fornecem uma ferramenta útil para a enumeração de espécies bacterianas em sistemas microbiologicamente complexos (Socransky et al., 2004).

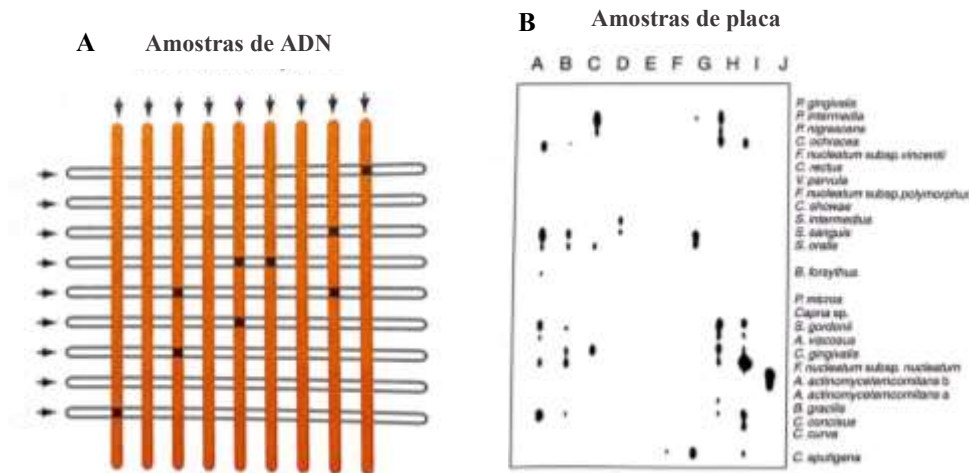


Figura 6 – *Checkerboard hybridization* (A) Resultados da hibridização *checkerboard* utilizada para identificação de bactérias numa amostra de um doente periodontal (B) (Adaptado de Wilson et al., 2018)

A técnica permite hibridizar um grande número de amostras de ADN contra um grande número de sondas de ADN em uma única membrana de suporte. As sondas são aplicadas a um filtro de membrana, que é colocado numa tela sobre uma câmara vazia que está ligada a uma linha de vácuo. As sondas são aplicadas em linhas, utilizando um modelo especial que faz uma vedação impermeável com o filtro de modo a evitar a contaminação cruzada. Um vácuo aplicado na câmara inferior atrai o fluido (que contém a sonda) para o filtro (Wilson et al., 2018).

Os genes ARNr da mesma amostra são amplificados usando PCR com nucleótidos marcados com fluorescência. Os *amplicons* marcados são aplicados ao filtro, que contém a sonda, em linhas perpendiculares às linhas da sonda. Após um período de incubação para permitir que sequências de ADN semelhantes ao ADN da sonda se hibridizem com a sonda, o ADN marcado é removido, e o filtro é lavado com tampão para remover o ADN não hibridizado. O ADN fluorescente ligado é visualizado como pontos escuros (Korona-Główniak et al., 2017; Wilson et al, 2018).

Na figura 6, *checkerboard hybridization* está a ser utilizada para identificar as bactérias numa amostra retirada da gengiva de um doente periodontal (Wilson et al., 2018).

No início, a hibridação ADN-ADN só foi útil para identificar microrganismos impossíveis de cultivar. Com o desenvolvimento e popularização das técnicas de PCR, foi desenvolvido um método de hibridização *reverse capture checkerboard*, que consiste na amplificação do gene 16S ARNr a partir de 30 microrganismos conhecidos. A técnica de "*Reverse-capture checkerboard*" permite a hibridação simultânea de 1350 amostras de 16S rADN numa única membrana (Ai et al., 2017; Korona-Głowniak et al., 2017).

A técnica tem sido utilizada para identificar microrganismos periodontopatogénicos associados à periodontite, avaliação da eficácia de tratamentos periodontais, e o efeito do tabagismo na recolonização bacteriana após tratamento (Ai et al., 2017; Korona-Głowniak et al., 2017).

3.5 Reação em Cadeia de Polimerase

A reação em cadeia de polimerase (PCR) refere-se a uma técnica amplamente utilizada nas ciências básicas e biomédicas. É uma técnica laboratorial utilizada para amplificar segmentos específicos de ADN para uma vasta gama de aplicações laboratoriais e/ou clínicas (Ghannam & Varacallo, 2021; Green & Sambrook, 2018).

Com base no trabalho de Panet e Khorana de amplificação bem-sucedida do ADN *in vitro*, Mullis e colegas de trabalho desenvolveram o PCR no início da década de 1980, tendo recebido o prémio Nobel apenas uma década mais tarde. Permitindo uma amplificação de mais de mil milhões de vezes de regiões-alvo específicas, tornou-se uma técnica em diversas aplicações (Ghannam & Varacallo, 2021; Green & Sambrook, 2018).

A perceção de que as bactérias podem ser identificadas de forma rápida e precisa através da obtenção da sequência dos seus genes ARNr, introduziu uma nova era na identificação bacteriana. O primeiro sucesso da revolução na microbiologia ambiental, foram os algoritmos de identificação detalhada da microbiologia clínica, onde até ao momento não existia nada equivalente. O procedimento foi simples: utilizar primários que reconhecessem as regiões conservadas dos genes 16S ARNr para amplificar o gene, obter uma sequência parcial, e depois compará-la com as bases de dados de sequências crescentes. É agora possível identificar um isolado bacteriano desconhecido em 24h por

esta abordagem; uma vez este processo seja automatizado, o tempo será ainda mais curto (Waters & Shapter, 2014; Wilson et al., 2018).

Este método utiliza os mesmos reagentes para todas as espécies bacterianas, porque são quase universais nas bactérias. Para além disso, esta abordagem tem agora sido utilizada para identificar bactérias que não são passíveis de cultivo (Waters & Shapter, 2014; Wilson et al., 2018).

3.6 PCR em tempo real (qPCR)

O “tempo real” implica que a recolha e análise de dados ocorra à medida que uma reação prossegue. No PCR em tempo real, a amplificação e a análise ocorrem em conjunto. Os reagentes necessários para análise, tais como corantes de ADN ou sondas fluorescentes, são adicionados à mistura de PCR antes da amplificação. Os dados são recolhidos durante a amplificação no mesmo tubo e no mesmo instrumento (Hawkins & Guest, 2017; Persing et al., 2016).

Não há transferências de amostras, adições de reagentes, ou separações de gel. Como não há necessidade de retirar amostras de recipientes fechados, o risco de contaminação do produto nas reações subsequentes é muito reduzido. O PCR em tempo real é potente, simples e rápido e está a substituir muitas técnicas convencionais no laboratório de microbiologia (Green & Sambrook, 2018; Persing et al., 2016).

No início, a tecnologia PCR limitava-se à análise qualitativa e/ou semi-quantitativa devido a limitações na capacidade de quantificação de ácidos nucleicos. Nessa altura, para verificar se o gene alvo tinha sido amplificado com sucesso, o produto de ADN era separado por tamanho através de eletroforese em gel de agarose. O brometo de etídio, uma molécula que fica fluorescente quando ligada ao ds ADN, poderia fornecer uma estimativa aproximada da quantidade de ADN, comparando aproximadamente o brilho de bandas separadas, mas não era suficientemente sensível para uma análise quantitativa rigorosa (Gadkar & Fillion, 2014; Ghannam & Varacallo, 2021).

Melhorias no desenvolvimento e instrumentação de fluoróforos levaram a termocicladores, que já não necessitavam apenas de medição do ADN do produto final. Este processo, conhecido como PCR em tempo real, ou PCR quantitativo (qPCR), permitiu a deteção de *dsDNA* durante a amplificação. Os termocicladores qPCR estão equipados com a capacidade de excitar fluoróforos em comprimentos de onda específicos, detetar a sua emissão com um fotodetector, e registar os valores. A coleção sensível de valores numéricos durante a amplificação aumentou fortemente o poder analítico quantitativo (Ghannam & Varacallo, 2021; Singht & Roy-Chowdhuri, 2016).

Diaz et al. (2016), para compreender a evolução do microbioma subgingival, num dos estudos mediu as alterações na carga bacteriana total desde a saúde até à periodontite, utilizando o PCR quantitativo em tempo real. A taxa de fluxo do fluido crevicular gengival (FCG) para o sulco tem demonstrado aumentar gradualmente da saúde para a gengivite e para a periodontite. Desde que as comunidades subgingivais dependem da FCG como fonte nutricional, as comunidades na periodontite podem alcançar uma biomassa elevada devido à maior disponibilidade de nutrientes derivados da inflamação. As alterações na composição das comunidades associadas à periodontite podem também facilitar atividades sinérgicas de aquisição de nutrientes.

3.7 Hibridização *in situ* fluorescente

Fluorescence in situ hybridization (FISH) é única entre as tecnologias de hibridização, no que respeita à utilização de corantes fluorescentes ligados a sondas de ácido nucleico. Os sinais fluorescentes derivados destas sondas podem ser detetados por microscopia de fluorescência, utilizando filtros específicos de estimulação e barreira para diferenciação de comprimentos de onda. A reação de hibridização ocorre *in situ*, com as células alvo geralmente observadas numa lâmina de microscópio com um modelo de Teflon (Persing et al., 2016; Wagner & Haider, 2012).

A FISH tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta importante para a deteção e identificação de organismos individuais em consórcios microbianos complexos de muitos ambientes diferentes. A identificação destes microrganismos é possível antes do seu cultivo; de facto, o cultivo pode não ser de todo necessário (Gu et al., 2017; Persing et al., 2016).

A utilização de FISH como parte da abordagem de “ciclo completo” permite a detecção *in situ* de bactérias não cultivadas e até agora desconhecidas, utilizando (i) técnicas baseadas em PCR para recuperar sequências de genes 16S ARNr do ambiente; (ii) conceção de sondas específicas de oligonucleótidos a partir dos dados de sequência disponíveis, e (iii) detecção direta de organismos visando sequências homólogas de ARNr na amostra original (Persing et al., 2016).

Ao longo das últimas décadas, diferentes técnicas têm sido aplicadas pelos investigadores para explicar as estruturas da placa microbiana, desde o microscópio eletrônico à coloração imuno-histoquímica, e a FISH (Gu et al., 2017; Liu et al., 2020).

De acordo com o estudo de Liu et al. (2020), foram distinguidas quatro camadas diferentes em placas subgengivais: da primeira à terceira camada estavam localizadas à superfície do dente e incrustadas na matriz intercelular, enquanto que a quarta camada era uma camada solta, sem organização clara, entre o biofilme e o tecido mole.

3.8 Pirosequenciação

As doenças periodontais são doenças multifatoriais, cuja iniciação e progressão requerem a participação de uma série de fatores, particularmente o envolvimento de bactérias subgengivais que contribuem para a formação do biofilme polimicrobiano (Camelo - Castillo et al., 2015).

Nos últimos anos, a pirosequenciação maciçamente paralela, uma abordagem molecular aberta, tem permitido a caracterização extensiva de populações microbianas de uma forma rentável e de alto rendimento (Camelo - Castillo *et al.*, 2015; Harrington et al., 2013).

A pirosequenciação é uma abordagem não baseada em gel, em tempo real, à sequência de ADN através da monitorização da atividade da polimerase do ADN, utilizando um ensaio de detecção enzimática de pirofosfato inorgânico luminométrico. Esta abordagem da sequenciação do ADN foi automatizada em vários formatos, que podem ser utilizados não só para a identificação de espécies de organismos microbianos, mas também para o rastreio da resistência. A pirosequenciação foi adotada numa variedade de aplicações

microbiológicas, uma vez que se adapta à procura de testes simples, sensíveis, específicos e robustos (Harrington et al., 2013; Persing et al., 2016).

A base para determinar a sequência por pirosequenciação é a detecção de pirofosfato inorgânico, um subproduto da síntese de ADN pela ADN polimerase. Um *primer* é ligado a um modelo de ADN de cadeia única e alongado na presença de ADN polimerase. Após a adição de um desoxinucleotídeo, o primer é prolongado e um pirofosfato inorgânico (PP), é libertado durante a síntese do ADN. O TFA sulfurilase é utilizado para converter o PP, em TFA, para produzir luz. Esta é uma reação estequiométrica, e a quantidade de luz produzida é proporcional à quantidade de PP pirofosfato inorgânico produzido e, portanto, ao número de nucleótidos incorporados. O nucleótido não incorporado é degradado com apirase antes de ser adicionado o próximo nucleótido. Desta forma, a informação sequencial sobre uma região é gerada quantitativamente em tempo real (Persing et al., 2016).

Os dados obtidos pelos diversos estudos realizados nos últimos 15 anos sugerem a existência de potenciais novos agentes patogénicos periodontais. Utilizando a pirosequenciação, Oliveira et al. (2016), relataram que as mudanças na estrutura comunitária da saúde para periodontite assemelham-se à sucessão ecológica, com o surgimento de novos táxons dominantes na periodontite, sem substituição de espécies primárias associadas à saúde. Os resultados mostraram que o biofilme subgingival de indivíduos com periodontite tinha maiores proporções de *Spirochetes*, *Synergistetes*, *Firmicutes*, e *Chloroflexi*, enquanto que as proporções de *Actinobacteria*, particularmente *Actinomyces*, eram mais elevadas em saúde periodontal.

4. Influência do Tratamento Periodontal no Microbioma Subgingival

O tratamento periodontal, inclui raspagem e alisamento radicular, que induz alterações ecológicas do ambiente subgingival, e provoca alterações na composição do microbioma subgingival.

Segundo o estudo de Belstrøm et al. (2018), o objetivo foi caracterizar e comparar as microbiotas subgingivais e salivares antes e depois do tratamento periodontal, para saber se as alterações da microbiota subgingival se refletiram na microbiota salivar. Este foi o

primeiro estudo de intervenção, que demonstra com sucesso o impacto do tratamento periodontal nos níveis salivares de microrganismos periodontopatogénicos específicos, que se correlacionaram com a abundância subgengival, em doentes com periodontite crónica.

Segundo Belstrøm et al. (2018), o tratamento periodontal resultou numa abundância relativa significativamente maior das espécies de *Streptococcus*, *Rothia* e *Actinomyces* em combinação com uma diminuição significativa das espécies *Porphyromonas* e *Treponema* (Figura 7).

Especificamente, uma redução de 5 vezes na abundância média de *Porphyromonas gingivalis* (4,2% versus 0,8%), uma redução de 4 vezes em *Tannerella forsythia* (1,3% versus 0,3%), e uma redução de 2 vezes em *Treponema denticola* (2,3% versus 1,1%) em combinação com um aumento de 10 vezes na abundância de *Rothiaaeria* (0,2% versus 2,6%) e um aumento de 3 vezes na *Rothia dentocariosa* (3,2% versus 10,9%) foram registados duas semanas após o tratamento periodontal (Figura 7) (Belstrøm et al., 2018).

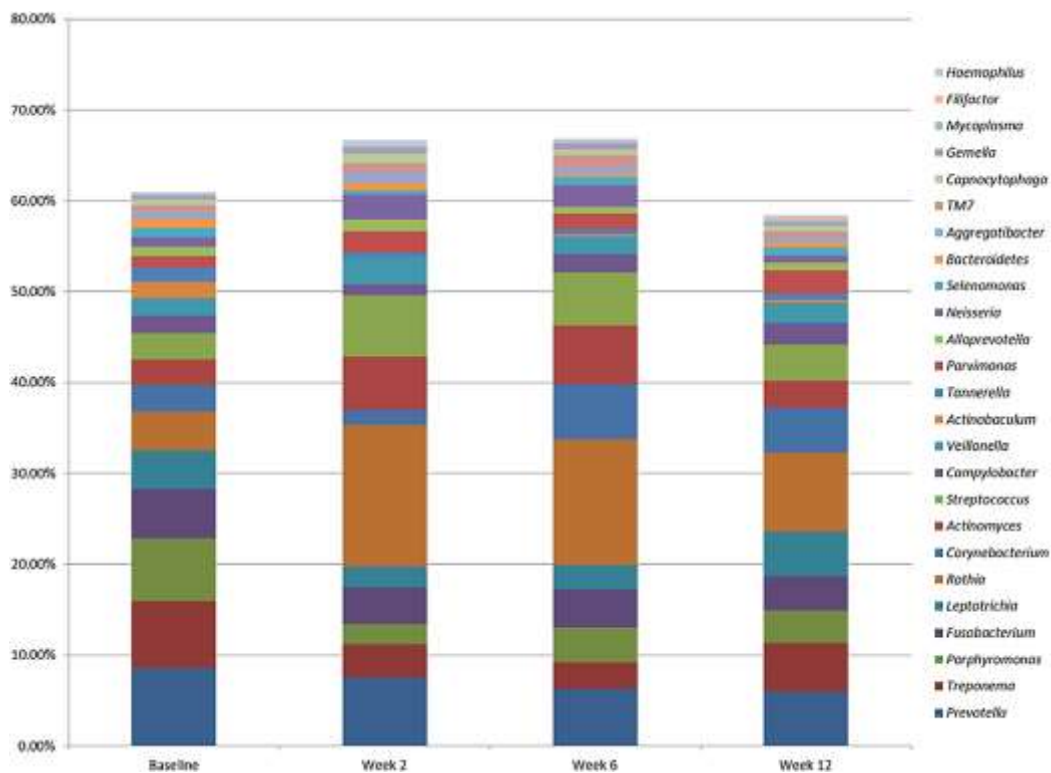


Figura 7- Géneros bacterianos predominantes na placa subgengival
Níveis médios de abundância relativa dos 25 géneros predominantes nas amostras subgengivais na referência de base e 2, 6, e 12 semanas após tratamento (Belstrøm et al., 2018).

A abundância relativa dos 25 géneros bacterianos predominantes e das 25 espécies bacterianas antes e depois do tratamento periodontal não cirúrgico é apresentada nas Figuras 7 e 8 (Belstrøm et al., 2018).

De acordo com Belstrøm et al. (2018), estas alterações foram gradualmente revertidas até 12 semanas após o tratamento. Além disso, o tratamento periodontal teve um impacto na diversidade microbiana do nicho subgingival, como diversidade- α na referência de base (2,73), que diminuiu após 2 semanas (2,50) e após 6 semanas (2,60) e completamente revertida após 12 semanas (2,78) ($p = 0,007$).

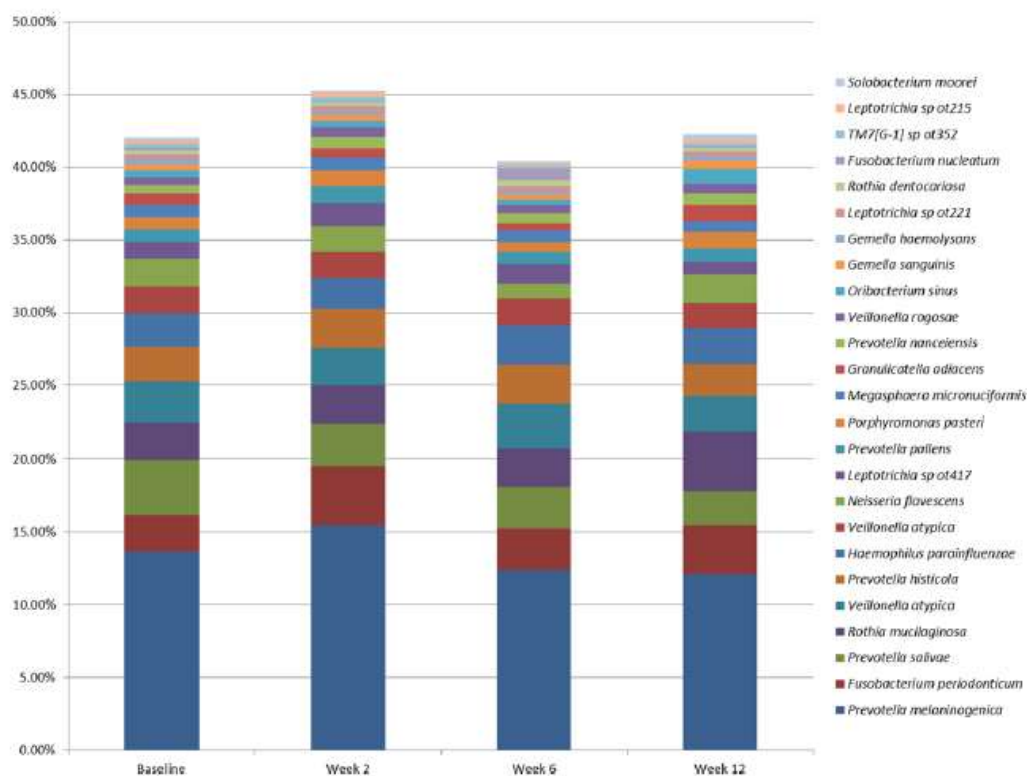


Figura 8- Espécies bacterianas predominantes na placa subgingival. Níveis médios de abundância relativa das 25 espécies predominantes nas amostras subgingivais na referência de base e 2, 6, e 12 semanas após tratamento (Belstrøm et al., 2018).

De acordo com dois estudos longitudinais, Juneman et al. (2012) e Laksmana et al. (2012), compararam a composição taxonómica do microbioma subgingival antes e depois do tratamento periodontal. Estes dois estudos, embora limitados a dois e quatro doentes, respetivamente, sugeriram um microbioma alterado após o tratamento periodontal. Uma vez que a periodontite é uma doença das bolsas subgingivais

individuais, a utilização de amostras agrupadas nestes estudos anteriores forneceu uma avaliação global incompleta que não fazia distinção entre os microbiomas individuais representados por cada localização afetada. O conhecimento detalhado das alterações dinâmicas do microbioma, dentro de cada bolsa, para diferentes estados clínicos, será extremamente útil no diagnóstico e prognóstico das localizações individuais dos dentes na prática clínica (Laksmana et al., 2012; Shi et al., 2015).

Segundo o estudo de Shi et al. (2015), o microbioma subgengival revelou mudanças significativas na composição taxonómica do estado doente para o estado tratado dentro de cada localização (Figura 9). Verificou-se que a uniformidade e riqueza da comunidade microbiana diminuiu significativamente após o tratamento. Isto está de acordo com a hipótese de que a doença periodontal está associada a alterações da complexa comunidade microbiana, e não ao domínio de um único agente patogénico. Esta observação de menor diversidade no estado tratado, é consistente com estudos de controlo de casos anteriores, em que o microbioma no estado saudável apresentava menor diversidade do que no estado doente.

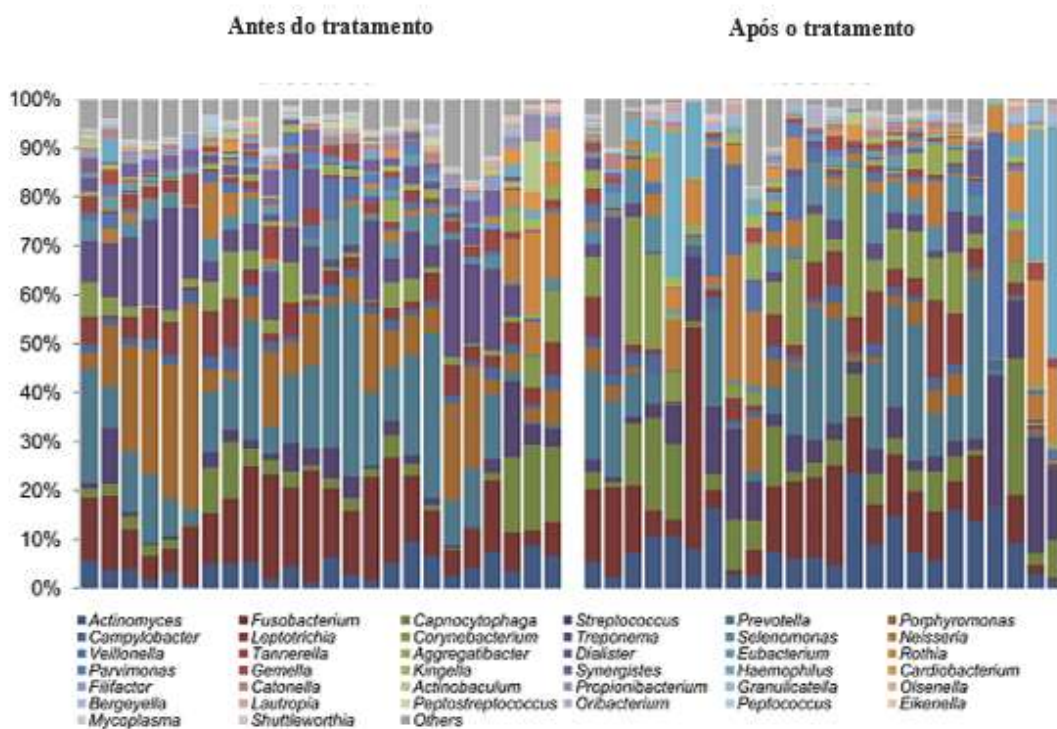


Figura 9 - Composição taxonómica do microbioma subgengival. As amostras recolhidas antes e após o tratamento periodontal nas mesmas localizações.

(Adaptado de Shi et al., 2015)

Utilizando uma análise de sequenciação metagenômica em grande escala, o estudo Shi et al. (2015), apresentou mudanças dinâmicas no microbioma subgengival de localizações de dentes individuais, dentro dos mesmos indivíduos, no estado doente e tratado. Este estudo apresenta um importante avanço do Projecto Microbioma Humano. Revelou que a comunidade microbiana mudou significativamente na composição taxonômica nos dois estados clínicos diferentes. No estado de doença, o microbioma é semelhante entre diferentes localizações de dentes e entre diferentes indivíduos; no entanto, no estado tratado, é altamente variável, mesmo entre localizações de dentes do mesmo indivíduo. Isto sugere que embora um grupo comum de microrganismos patogênicos seja responsável pela doença, um periodonto saudável pode acomodar uma variedade de microrganismos associados à saúde.

Segundo o estudo de Chen et al. (2018), verificou que os seguintes gêneros estavam associados à placa subgengival da periodontite: *Filifactor*, *Treponema*, *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcaceae*, *Desulfobulbus*, *Lachnospiraceae*, *Mogibacterium*, *Alloprevotella*, *Hallella*, *Phocaeicola*, *Johnsonella*, e *Mycoplasma*. Os gêneros que foram encontrados associados à placa subgengival na saúde incluíram *Capnocytophaga*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, e *Veillonella*, *Exiguobacterium*, *Paludibacter* e *Opitutus*. Os seguintes gêneros, *Leptotrichia* e *Prevotella* estavam associadas tanto à doença como à saúde, sugerindo potenciais patogênicos distintos de bactérias do mesmo gênero. A diminuição das espécies periodontopatogênicas após o tratamento periodontal foi observada neste estudo.

III. CONCLUSÃO

O desenvolvimento e a prevalência de tecnologias moleculares independentes de cultura têm proporcionado um progresso revolucionário nos estudos microbianos. O desenvolvimento destas tecnologias contribui significativamente para a investigação de microrganismos que não podem ser detetados por métodos tradicionais, tais como métodos dependentes de cultura.

A detecção de espécies bacterianas em doentes com periodontite é considerada útil para o diagnóstico e tratamento clínico. A colheita de amostras da placa subgingival é a forma comum de determinação de bactérias periodontopatogénicas.

A caracterização da função da microbiota é importante para melhorar a compreensão de como as comunidades microbianas dão origem à doença periodontal ou saúde.

A compreensão abrangente da ecologia da microbiota subgingival e da relação dinâmica entre o desenvolvimento da doença e do microbioma subgingival é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e tratamento da periodontite. Utilizar a sequenciação de alto rendimento do gene 16S ARNr pode nos fornecer uma visão mais ampla do que os métodos tradicionais, como o uso de PCR ou PCR quantitativo em tempo real. Devido às vantagens de alto rendimento, a sequenciação do gene 16S ARNr pode detetar mais microrganismos existentes nas amostras, fornecendo informações abrangentes sobre a composição e estrutura dos microrganismos da placa subgingival, bem como a sua tendência de mudança com diferentes estados periodontais.

Com os recentes avanços tecnológicos na sequenciação, os organismos recentemente identificados têm sido notificados a níveis mais elevados na doença periodontal do que na saúde.

O surgimento da sequenciação de próxima geração (NGS) do gene 16S ARNr torna possível mostrar uma visão quase imparcial da composição bacteriana, que tem a vantagem de detetar bactérias não-cultiváveis. Nos últimos anos, o NGS tem sido amplamente utilizado para analisar a composição bacteriana subgengival e para caracterizar as mudanças da composição entre a saúde e a doença periodontal.

Logo, é imprescindível estudar mais profundamente as alterações microbianas nas bolsas periodontais no início e progressão das diferentes formas de periodontite, a fim de proporcionar aos doentes protocolos eficazes de prevenção e tratamento.

IV. BIBLIOGRAFIA

- Abusleme, L., Hong, B. Y., Dupuy, A. K., Strausbaugh, L. D., & Diaz, P. I. (2014). Influence of DNA extraction on oral microbial profiles obtained via 16S rRNA gene sequencing. *Journal of oral microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3402/jom.v6.23990>
- Ai, D., Huang, R., Wen, J., Li, C., Zhu, J., & Xia, L. C. (2017). Integrated metagenomic data analysis demonstrates that a loss of diversity in oral microbiota is associated with periodontitis. *BMC genomics*, 18(1), 1041. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3254-5>
- Aimetti, M. (2014). Nonsurgical periodontal treatment. *The international journal of esthetic dentistry*, 9(2), 251–267.
- Al-hebshi, N. N., Al-Alimi, A., Taiyeb-Ali, T., & Jaafar, N. (2015). Quantitative analysis of classical and new putative periodontal pathogens in subgingival biofilm: a case-control study. *Journal of periodontal research*, 50(3), 320–329. <https://doi.org/10.1111/jre.12210>
- Belstrøm, D., Grande, M. A., Sembler-Møller, M. L., Kirkby, N., Cotton, S. L., Paster, B. J., & Holmstrup, P. (2018) Influence of periodontal treatment on subgingival and salivary microbiotas. *J Periodontol*. 89(5):531-539. doi: 10.1002/JPER.17-0377.
- Benedyk, M., Mydel, P. M., Delaleu, N., Płaza, K., Gawron, K., Milewska, A., Maresz, K., Koziel, J., Pyrc, K., & Potempa, J. (2016). Gingipains: Critical Factors in the Development of Aspiration Pneumonia Caused by *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of innate immunity*, 8(2), 185–198. <https://doi.org/10.1159/000441724>
- Borgnakke, W. S. (2015). Does Treatment of Periodontal Disease Influence Systemic Disease?. *Dental clinics of North America*, 59(4), 885–917. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2015.06.007>

- Boutin, S., Hagenfeld, D., Zimmermann, H., El Sayed, N., Höpker, T., Greiser, H. K., Becher, H., Kim, T. S., & Dalpke, A. H. (2017). Clustering of Subgingival Microbiota Reveals Microbial Disease Ecotypes Associated with Clinical Stages of Periodontitis in a Cross-Sectional Study. *Frontiers in microbiology*, *8*, 340. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00340>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, *11*(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Camelo-Castillo, A., Novoa, L., Balsa-Castro, C., Blanco, J., Mira, A., & Tomás, I. (2015). Relationship between periodontitis-associated subgingival microbiota and clinical inflammation by 16S pyrosequencing. *Journal of clinical periodontology*, *42*(12), 1074–1082
- Cao, Y., Qiao, M., Tian, Z., Yu, Y., Xu, B., Lao, W., Ma, X., & Li, W. (2018). Comparative Analyses of Subgingival Microbiome Chronic Periodontitis Patients with and Without IgA Nephropathy by HighThroughput 16S rRNA Sequencing. *Cell Physiol Biochem. Cellular Physiology and Biochemistry*, *47*(2):774-783. doi: 10.1159/000490029.
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of clinical periodontology*, *45 Suppl 20*, S1–S8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>
- Chen, C., Hemme, C., Beleno, J., Shi, Z. J., Ning, D., Qin, Y., Tu, Q., Jorgensen, M., He, Z., Wu, L., & Zhou, J. (2018). Oral microbiota of periodontal health and disease and their changes after nonsurgical periodontal therapy. *The ISME journal*, *12*(5), 1210–1224. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0037-1>

- Choi, I. A., Kim, J. H., Kim, Y. M., Lee, J. Y., Kim, K. H., Lee, E. Y., Lee, E. B., Lee, Y. M., & Song, Y. W. (2016). Periodontitis is associated with rheumatoid arthritis: a study with longstanding rheumatoid arthritis patients in Korea. *The Korean journal of internal medicine*, 31(5), 977–986. <https://doi.org/10.3904/kjim.2015.202>
- Costa, P. R., Resende, S. M., Pinto, G. M., & Mendes, L. (2019). Diagnóstico periodontal: um fluxograma de decisão para a nova classificação. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 60(4):189-196. <http://doi.org/10.24873/j.rpemd.2020.01.690>
- Daalderop, L. A., Wieland, B. V., Tomsin, K., Reyes, L., Kramer, B. W., Vanterpool, S. F., & Been, J. V. (2018). Periodontal Disease and Pregnancy Outcomes: Overview of Systematic Reviews. *JDR clinical and translational research*, 3(1), 10–27. <https://doi.org/10.1177/2380084417731097>
- Diaz, P. I., Hoare, A., & Hong, B. Y. (2016). Subgingival Microbiome Shifts and Community Dynamics in Periodontal Diseases. *Journal of the California Dental Association*, 44(7), 421–435.
- Duran-Pinedo, A. E., Chen, T., Teles, R., Starr, J. R., Wang, X., Krishnan, K., & Frias-Lopez, J. (2014). Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis. *The ISME journal*, 8(8), 1659–1672. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.23>
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., & Saito, M. (2016). Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *Journal of UOEH*, 38(3), 223–232. <https://doi.org/10.7888/juoeh.38.223>
- Gadkar, V. y., & Filion, M. (2014). New Developments in Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Technology. *Current issues in molecular biology*, 16, 1–6.

- Gasner, N. S., & Schure, R. S. (2020). Periodontal Disease. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Genco, R. J., LaMonte, M. J., McSkimming, D. I., Buck, M. J., Li, L., Hovey, K. M., Andrews, C. A., Sun, Y., Tsompana, M., Zheng, W., Banack, H. R., Murugaiyan, V., & Wactawski-Wende, J. (2019). The Subgingival Microbiome Relationship to Periodontal Disease in Older Women. *Journal of dental research*, 98(9), 975–984. <https://doi.org/10.1177/0022034519860449>
- Ghannam, M. G., & Varacallo, M. (2021). Biochemistry, Polymerase Chain Reaction. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Giannobile, W. V., Kornman, K. S., & Williams, R. C. (2013). Personalized medicine enters dentistry: what might this mean for clinical practice?. *Journal of the American Dental Association* (1939), 144(8), 874–876. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2013.0200>
- Graziani, F., Karapetsa, D., Alonso, B., & Herrera, D. (2017). Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease?. *Periodontology* 2000, 75(1), 152–188. <https://doi.org/10.1111/prd.12201>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). Analysis and Normalization of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Experimental Data. *Cold Spring Harbor protocols*, (10). <https://doi.org/10.1101/pdb.top095000>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor protocols*, (5). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095117>
- Greene, S. E., & Reid, A. (2013). *Viruses Throughout Life & Time: Friends, Foes, Change Agents: A Report on an American Academy of Microbiology Colloquium San Francisco*. American Society for Microbiology.

- Gu, J., Smith, J. L., & Dowling, P. K. (2017). Fluorescence In Situ Hybridization Probe Validation for Clinical Use. *Methods in molecular biology*, *1541*, 101–118. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6703-2_10
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature reviews. Microbiology*, *10*(10), 717–725. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>
- Hall, M., & Beiko, R. G. (2018). 16S rRNA Gene Analysis with QIIME2. *Methods in molecular biology*, *1849*, 113–129. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8728-3_8
- Harrington, C. T., Lin, E. I., Olson, M. T., & Eshleman, J. R. (2013). Fundamentals of pyrosequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine*, *137*(9), 1296–1303. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0463-RA>
- Hawkins, S., & Guest, P. C. (2017). Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods in molecular biology*, *1546*, 125–133. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8_8
- Hong, B. Y., Furtado Araujo, M. V., Strausbaugh, L. D., Terzi, E., Ioannidou, E., & Diaz, P. I. (2015). Microbiome profiles in periodontitis in relation to host and disease characteristics. *PloS one*, *10*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127077>
- Hujoel, P. P., & Lingström, P. (2017). Nutrition, dental caries and periodontal disease: a narrative review. *Journal of clinical periodontology*, *44 Suppl 18*, S79–S84. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12672>
- Jeffcoat, M. K., Jeffcoat, R. L., Gladowski, P. A., Bramson, J. B., & Blum, J. J. (2014). Impact of periodontal therapy on general health: evidence from insurance data for five systemic conditions. *American journal of preventive medicine*, *47*(2), 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2014.04.001>

- Jia, L., Han, N., Du, J., Guo, L., Luo, Z., & Liu, Y. (2019). Pathogenesis of Important Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis* via Toll-Like Receptors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *9*, 262. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00262>
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature reviews. Disease primers*, *3*, 17038. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>
- Kirst, M. E., Li, E. C., Alfant, B., Chi, Y. Y., Walker, C., Magnusson, I., & Wang, G. P. (2015). Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis. *Applied and environmental microbiology*, *81*(2), 783–793. <https://doi.org/10.1128/AEM.02712-14>
- Korona-Główniak, I., Siwiec, R., Berger, M., Malm, A., & Szymańska, J. (2017). Molecular diagnostics of periodontitis. *Postepy higieny i medycyny doświadczalnej*, *71*(0), 47–56. <https://doi.org/10.5604/17322693.1229820>
- Krishnan, K., Chen, T., & Paster, B. J. (2017). A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral diseases*, *23*(3), 276–286. <https://doi.org/10.1111/odi.12509>
- Laksmana, T., Kittichotirat, W., Huang, Y., Chen, W., Jorgensen, M., Bumgarner, R., & Chen, C. (2012). Metagenomic analysis of subgingival microbiota following non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *The open dentistry journal*, *6*, 255–261. <https://doi.org/10.2174/1874210601206010255>
- Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature reviews. Microbiology*, *16*(12), 745–759. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>
- Larsen, T., & Fiehn, N. E. (2017). Dental biofilm infections - an update. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, *125*(4), 376–384. <https://doi.org/10.1111/apm.12688>

- Leite, F., Nascimento, G. G., Scheutz, F., & López, R. (2018). Effect of Smoking on Periodontitis: A Systematic Review and Meta-regression. *American journal of preventive medicine*, 54(6), 831–841. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2018.02.014>
- Linden, G. J., Lyons, A., & Scannapieco, F. A. (2013). Periodontal systemic associations: review of the evidence. *Journal of clinical periodontology*, 40 Suppl 14, S8–S19. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12064>
- Liu, G., Chen, F., Cai, Y., Chen, Z., Luan, Q., & Yu, X. (2020). Measuring the subgingival microbiota in periodontitis patients: Comparison of the surface layer and the underlying layers. *Microbiology and immunology*, 64(2), 99–112. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12759>
- López-Martínez, J., Chueca, N., Padiál-Molina, M., Fernández-Caballero, J. A., García, F., O'Valle, F., & Galindo-Moreno, P. (2020). Bacteria associated with periodontal disease are also increased in health. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 25(6), 745–751. <https://doi.org/10.4317/medoral.23766>
- Lourenço, T. G., Heller, D., Silva-Boghossian, C. M., Cotton, S. L., Paster, B. J., & Colombo, A. P. (2014). Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *Journal of clinical periodontology*, 41(11), 1027–1036. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12302>
- Mawardi, H. H., Elbadawi, L. S., & Sonis, S. T. (2015). Current understanding of the relationship between periodontal and systemic diseases. *Saudi medical journal*, 36(2), 150–158. <https://doi.org/10.15537/smj.2015.2.9424>
- Mehrotra, N., & Singh, S. (2021). Periodontitis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Mohanty, R., Asopa, S. J., Joseph, M. D., Singh, B., Rajguru, J. P., Saidath, K., & Sharma, U. (2019). Red complex: Polymicrobial conglomerate in oral flora: A review. *Journal of family medicine and primary care*, 8(11), 3480–3486. https://doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe_759_19

- Morgan, X. C., & Huttenhower, C. (2012). Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS computational*
- Naginyte, M., Do, T., Meade, J., Devine, D. A., & Marsh, P. D. (2019). Enrichment of periodontal pathogens from the biofilms of healthy adults. *Scientific reports*, 9(1), 5491. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41882>
- Nayak, A., Bhat, K., Shivanaikar, S., Pushpa, P., Kugaji, M. & Kumbar, V. (2018). Detection of red complex organisms in chronic periodontitis by multiplex polymerase chain reaction. *J Adv Clin Res Insights*, 5, 139-44.
- Nazir M. A. (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International journal of health sciences*, 11(2), 72–80.
- Nguyen, N. P., Warnow, T., Pop, M., & White, B. (2016). A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *NPJ biofilms and microbiomes*, 2, 16004. <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.4>
- Oliveira, R. R., Fermiano, D., Feres, M., Figueiredo, L. C., Teles, F. R., Soares, G. M., & Faveri, M. (2016). Levels of Candidate Periodontal Pathogens in Subgingival Biofilm. *Journal of dental research*, 95(6), 711–718. <https://doi.org/10.1177/0022034516634619>
- Olson, N. D., Kumar, M. S., Li, S., Braccia, D. J., Hao, S., Timp, W., Salit, M. L., Stine, O. C., & Bravo, H. C. (2020). A framework for assessing 16S rRNA marker-gene survey data analysis methods using mixtures. *Microbiome*, 8(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00812-1>
- Park, O. J., Yi, H., Jeon, J. H., Kang, S. S., Koo, K. T., Kum, K. Y., Chun, J., Yun, C. H., & Han, S. H. (2015). Pyrosequencing Analysis of Subgingival Microbiota in Distinct Periodontal Conditions. *Journal of dental research*, 94(7), 921–927. <https://doi.org/10.1177/0022034515583531>

- Patini, R., Staderini, E., Lajolo, C., Lopetuso, L., Mohammed, H., Rimondini, L., Rocchetti, V., Franceschi, F., Cordaro, M., & Gallenzi, P. (2018). Relationship between oral microbiota and periodontal disease: a systematic review. *European review for medical and pharmacological sciences*, 22(18), 5775–5788. https://doi.org/10.26355/eurrev_201809_1590
- Pérez-Chaparro, P. J., Gonçalves, C., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Lobão, E., Tamashiro, N., Duarte, P., & Feres, M. (2014). Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *Journal of dental research*, 93(9), 846–858. <https://doi.org/10.1177/0022034514542468>
- Persing, H. D., Tenover, C. F., Tang, Y. W., Nolte, S. F., Hayden, T. R. & Van Belkum, A. (2016). *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. (3rd ed., 3-11, 63-64, 261-264)
- Plančak, D., Musić, L., & Puhar, I. (2015). Quorum Sensing of Periodontal Pathogens. *Acta stomatologica Croatica*, 49(3), 234–241. <https://doi.org/10.15644/asc49/3/6>
- Pranckeviciene, A., Siudikiene, J., Ostrauskas, R., & Machiulskiene, V. (2014). Severity of periodontal disease in adult patients with diabetes mellitus in relation to the type of diabetes. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 158(1), 117–123. <https://doi.org/10.5507/bp.2013.098>
- Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H. S., & Perkins, D. L. (2016). Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochemical and biophysical research communications*, 469(4), 967–977. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.083>

- Schlaberg, R., Chiu, C. Y., Miller, S., Procop, G. W., Weinstock, G., Professional Practice Committee and Committee on Laboratory Practices of the American Society for Microbiology, & Microbiology Resource Committee of the College of American Pathologists (2017). Validation of Metagenomic Next-Generation Sequencing Tests for Universal Pathogen Detection. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 141(6), 776–786. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0539-RA>
- Schriefer, A. E., Cliften, P. F., Hibberd, M. C., Sawyer, C., Brown-Kennerly, V., Burcea, L., Klotz, E., Crosby, S. D., Gordon, J. I., & Head, R. D. (2018). A multi-amplicon 16S rRNA sequencing and analysis method for improved taxonomic profiling of bacterial communities. *Journal of microbiological methods*, 154, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.019>
- Shaikh, H., Patil, S. H., Pangam, T. S., & Rathod, K. V. (2018). Polymicrobial synergy and dysbiosis: An overview. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 22(2), 101–106. https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_385_17
- Sharpton T. J. (2014). An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in plant science*, 5, 209. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00209>
- Shi, B., Chang, M., Martin, J., Mitreva, M., Lux, R., Klokkevold, P., Sodergren, E., Weinstock, G. M., Haake, S. K., & Li, H. (2015). Dynamic changes in the subgingival microbiome and their potential for diagnosis and prognosis of periodontitis. *mBio*, 6(1), 01926-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01926-14>
- Shi, M., Wei, Y., Hu, W., Nie, Y., Wu, X., & Lu, R. (2018). The Subgingival Microbiome of Periodontal Pockets With Different Probing Depths in Chronic and Aggressive Periodontitis: A Pilot Study. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 124. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00124>.
- Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., Hernández, M., & Gamonal, J. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of applied oral science: revista FOB*, 23(3), 329–355. <https://doi.org/10.1590/1678-775720140259>

- Singh, C., & Roy-Chowdhuri, S. (2016). Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Methods in molecular biology*, 1392, 161–176. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0_15
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current protocols in molecular biology*, 122(1), 59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, C., Martin, L., Haffajee, J. A., Uzel, N. G., & Goodson, J. M. (2004). Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral microbiology and immunology*, 19(6), 352–362. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.2004.00168.x>
- Stathopoulou, P. G., Buduneli, N. & Kinane, D. F. (2015) Systemic biomarkers for periodontitis. *Curr. Oral Health Rep.* 2, 218–226. <https://doi.org/10.1007/s40496-015-0072-9>
- Steffens, P. J., & Marcantonio, C. A. R (2018) Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. *Rev Odontol UNESP*, 47(4): 189-197. <https://doi.org/10.1590/1807-2577.04704>
- Suvan, J., Leira, Y., Moreno Sancho, F. M., Graziani, F., Derks, J., & Tomasi, C. (2020). Subgingival instrumentation for treatment of periodontitis. A systematic review. *Journal of clinical periodontology*, 47 Suppl 22, 155–175. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13245>
- Szafranski, S. P., Wos-Oxley, M. L., Vilchez-Vargas, R., Jáuregui, R., Plumeier, I., Klawonn, F., Tomasch, J., Meisinger, C., Kühnisch, J., Sztajer, H., Pieper, D. H., & Wagner-Döbler, I. (2015). High-resolution taxonomic profiling of the subgingival microbiome for biomarker discovery and periodontitis diagnosis. *Applied and environmental microbiology*, 81(3), 1047–1058. <https://doi.org/10.1128/AEM.03534-14>

- Tsai, C. Y., Tang, C. Y., Tan, T. S., Chen, K. H., Liao, K. H., & Liou, M. L. (2018). Subgingival microbiota in individuals with severe chronic periodontitis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*.51(2):226-234. doi: 10.1016/j.jmii.2016.04.007.
- Van dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D., & Thermes, C. (2018). The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in genetics: TIG*, 34(9), 666–681. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.008>
- Wade, W. G., & Prosdocimi, E. M. (2020). Profiling of Oral Bacterial Communities. *Journal of dental research*, 99(6), 621–629. <https://doi.org/10.1177/0022034520914594>
- Wagner, M., & Haider, S. (2012). New trends in fluorescence in situ hybridization for identification and functional analyses of microbes. *Current opinion in biotechnology*, 23(1), 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.010>
- Waters, D. L., & Shapter, F. M. (2014). The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods in molecular biology*, 1099, 65–75. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_7
- Wei, Y., Shi, M., Zhen, M., Wang, C., Hu, W., Nie, Y., & Wu, X. (2019). Comparison of Subgingival and Buccal Mucosa Microbiome in Chronic and Aggressive Periodontitis: A Pilot Study. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 53. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00053>
- Wilson, A. B., Winkler, M. & T. Ho, B. (2018). Bacterial Pathogenesis: *A Molecular Approach*. (4 nd ed., pp. 38-42).
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5088–5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>