EGAS MONIZ SCHOOL of HEALTH & SCIENCE | INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

A RELAÇÃO DA MICROBIOTA ORAL COM AS DOENÇAS PERIODONTAIS

Trabalho submetido por
Alexandre Hugo Domecq
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2024

EGAS MONIZ SCHOOL of HEALTH & SCIENCE | INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

A RELAÇÃO DA MICROBIOTA ORAL COM AS DOENÇAS PERIODONTAIS

Trabalho submetido por
Alexandre Hugo Domecq
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professor Doutor Carlos Manuel Lopes Monteiro

e coorientado por
Professora Doutora Júlia Maria Guilherme Ribeiro Antunes

setembro de 2024

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador de tese, Doutor Carlos Manuel Lopes Monteiro, pela sua disponibilidade, pelos seus preciosos conselhos e pela confiança que me concedeu ao longo da elaboração desta dissertação.

À minha coorientadora de tese, Doutora Júlia Maria Guilherme Ribeiro Antunes, pela sua devoção, pela clareza com que dissipou muitas dúvidas, bem como pelos constantes encorajamentos.

Aos professores que me acompanharam durante estes cinco anos, pela qualidade do seu ensino e pelos conhecimentos transmitidos.

À minha família, pelo apoio incondicional e pelos incentivos ao longo deste percurso. Sem eles, nada disto teria sido possível.

Aos meus amigos em França, pelo seu apoio e amizade ao longo destes cinco anos.

Aos amigos que conheci na Egas Moniz, que também me apoiaram e com quem partilhei momentos inesquecíveis.

RESUMO

As doenças periodontais são processos patológicos que envolvem o periodonto, um termo utilizado para descrever o aparelho de suporte que envolve o dente, que inclui o tecido gengival, o osso alveolar, o cemento e o ligamento periodontal (Gasner & Schure, 2023).

Embora o biofilme periodontopatogénico disbiótico seja o principal fator etiológico, a doença é modulada por factores genéticos, ambientais e comportamentais relacionados com o hospedeiro em diferentes indivíduos (Hartenbach et al., 2020).

A disbiose da microbiota oral que pode levar à sobrepopulação de certos microrganismos patogénicos, esta nomeadamente observada em muitas doenças orais como a doença periodontal (Santacroce et al., 2023).

Por exemplo, a disbiose de bactérias livres na saliva (que é um mediador vital na cavidade oral) pode estar relacionada com o aparecimento, desenvolvimento, prognóstico e recorrência de doenças periodontais e verificou-se que a composição da comunidade microbiana salivar diferiu significativamente entre pacientes com periodontite crónica e controlos saudáveis (Diao et al., 2021; Lundmark et al., 2019).

As evidências que ligam a relação entre perturbações do microbioma oral e várias doenças sistémicas aumentaram a consciência da importância do microbioma oral na regulação de numerosos processos no corpo humano e, por conseguinte, do seu impacto no desenvolvimento de muitas doenças (Kozak & Pawlik, 2023).

Isto é importante porque a doença periodontal pode ser um fator de risco para certas doenças sistémicas, como a diabetes e as doenças cardiovasculares e o pleno conhecimento do papel do microbioma oral na saúde e no desenvolvimento de processos patológicos pode então contribuir para a prevenção e o tratamento de doenças (Kozak & Pawlik, 2023; Liccardo et al., 2019).

O objetivo desta tese será recolher informação sobre a relação entre a composição da microbiota oral, fluido crevicular gengival e da saliva com as doenças periodontais, de modo a determinar se existe uma associação e quais são os mecanismos dessa associação.

Palavras-Chave: Doenças periodontais, microbiota oral, saliva, fluido crevicular gengival

ABSTRACT:

Periodontal diseases are pathological processes involving the periodontium, a term used to describe the supporting tissus surrounding the tooth, which includes the gingival tissue, the alveolar bone, the cementum and the periodontal ligament (Gasner & Schure, 2023).

Although dysbiotic periodontopathogenic biofilm is the main etiological factor, the disease is modulated by host-related genetic, environmental and behavioral factors in different individuals (Hartenbach et al., 2020).

Dysbiosis of the oral microbiota, which can lead to the overpopulation of certain pathogenic microorganisms, is observed in many oral diseases such as periodontal disease (Santacroce et al., 2023).

For example, the dysbiosis of free bacteria in saliva (which is a vital mediator in the oral cavity) may be related to the onset, development, prognosis and recurrence of periodontal diseases and it was found that the composition of the salivary microbial community differed significantly between patients with chronic periodontitis and healthy controls (Diao et al., 2021; Lundmark et al., 2019).

Evidence linking the relationship between disturbances in the oral microbiome and various systemic diseases has increased awareness of the importance of the oral microbiome in regulating numerous processes in the human body and, therefore, its impact on the development of many diseases (Kozak & Pawlik, 2023).

This is important because periodontal disease can be a risk factor for certain systemic diseases, such as diabetes and cardiovascular disease, and full knowledge of the role of the oral microbiome in health and the development of pathological processes can then contribute to the prevention and treatment of disease (Kozak & Pawlik, 2023; Liccardo et al., 2019).

The aim of this thesis will be to gather information on the relationship between the composition of the oral microbiota, gingival crevicular fluid and saliva with periodontal diseases, in order to determine whether there is an association and what the mechanisms of this association are.

Keywords: Periodontal diseases, oral microbiota, saliva, gingival crevicular fluid

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS 7
ÍNDICE DE TABELAS 9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 11
I. INTRODUÇÃO 13
II. DESENVOLVIMENTO 15
1. A microbiota oral 15
1.1. Sequenciação 16
1.1.1. Sequências OTU e ASV 17
1.1.1.1. Sequências OTU 17
1.1.1.2. Sequências ASV 17
1.1.2. Sequenciação 16S rRNA 18
1.1.3. Sequenciação Shotgun 19
1.1.4. Composição 20
1.1.5. Influência dos nichos orais 25
1.2. Principais alterações na composição durante a periodontite 27
1.3. Reacções do microbioma na periodontite 30
2. Doença periodontal 36
2.1. Definição 36
2.2. Fisiopatologia 37
2.2.1. Hipótese da placa não específica 37
2.2.2. Hipótese da placa específica 38
2.2.3. Hipótese da placa ecológica 39
2.2.4. Hipótese do patogénio-chave 39
2.2.5. Modelo IMPEDE 42
2.3. Factores de risco 47
2.3.1. Factores de risco modificáveis 48
2.3.1.1. Tabagismo 48
2.3.1.2. Diabetes Mellitus 48
2.3.1.3. Doenças cardiovasculares 49
2.3.1.4. Perturbações induzidas por drogas (exemplo: cannabis) 50
2.3.1.5. Stress 51
2.3.1.6. Obesidade 52
2.3.2. Factores de risco não modificáveis 53

2.3.2.1. Osteoporose 53
2.3.2.2. Alterações hormonais femininas 53
2.4. Diagnóstico 54
2.5. Tratamento 57
2.5.1. Tratamento não cirúrgico 57
2.5.2. Tratamento cirúrgico 62
2.5.3. Tratamento periodontal de suporte 65
III. CONCLUSÃO 69
IV. BIBLIOGRAFIA 71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Glicólise (Adaptado de Bar-Even et al., 2012). 31
Figura 2- O mecanismo catalítico das proteases de cisteína (Adaptado de Yongqing et al., 2011). 32
Figura 3 - Doença disbiótica induzida por patogénio-chave (Adaptado de Hajishengallis et al., 2012). 41
Figura 4- Modelo IMPEDE**:** Uma proposta para ilustrar como a inflamação atua como o principal impulsionador da periodontite associada à placa. (Adaptado de Van Dyke et al., 2020). 43
Figura 5- Estádios de Classificação da Doença Periodontal e Tratamento (Adaptado de Van Dyke et al., 2020) 44
Figura 6- Modelo sugerido da relação entre doença periodontal e doença cardiovascular (Adaptado de Carrizales-Sepulveda et al., 2018). 50
Figura 7- Mecanismos que conectam a adaptação inadequada ao stress com a progressão das doenças periodontais e/ou resultados subótimos de tratamento (Adaptado de Gunepin et al., 2018)..... 52
Figura 8- Os estádios principais da doença periodontal (Adaptado de Kinane et al., 2017)..... 56
Figura 9- Elevação do retalho durante desbridamento com retalho aberto do defeito intraósseo (Adaptado de Graziani et al., 2017). 63
Figura 10- Aplicação de xenoenxerto e membrana de colagénio para regeneração tecidual guiada (Adaptado de Graziani et al., 2017). 65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - A composição do microbioma oral (Adaptado de Rajasekaran et al., 2024).. 22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S rRNA - 16S ARN Ribossomal (do inglês: 16S Ribosomal RNA)
ADN - Ácido Desoxirribonucleico
ARN - Ácido Ribonucléico
ASCVD - Doença Cardiovascular Aterosclerótica (do inglês: Atherosclerotic Cardiovascular Disease)
ASV - Variante de Sequência Amplicon (do inglês: Amplicon Sequence Variant)
CPR - Candidate Phyla Radiation
CSV - Compostos Sulfurados Voláteis
DCV - Doença Cardiovascular
FCG - Fluido Crevicular Gengival
IL-1 - Interleucina 1
IL-6 - Interleucina 6
IL-8 - Interleucina 8
IMPEDE - Emergência Polimicrobiana Mediada por Inflamação e Exacerbação Disbiótica (do inglês: Inflammation-Mediated-Polymicrobial-Emergence and Dysbiotic-Exacerbation)
LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade (do inglês: Low-Density Lipoprotein)
LPS - Lipopolissacarídeo
MMPs - Metaloproteinases da Matriz (do inglês: Matrix Metalloproteinases)
NFAL - Nova Fixação Assistido por Laser
NGS - Sequenciação de Nova Geração (do inglês: Next-Generation Sequencing)
OTU - Unidade Taxonómica Operacional (do inglês: Operational Taxonomic Unit)
PCR - Proteína C-Reativa
tPCR - Técnica da reação em cadeia da polimerase (do inglês: Polymerase Chain Reaction)
PDGF-BB - Fator de Crescimento BB Derivado de Plaquetas (do inglês: Platelet-Derived Growth Factor BB)
PMN - Neutrófilos polimorfonucleares (do inglês: Polymorphonuclear Neutrophils)
ROS - Espécies Reativas de Oxigénio (do inglês: Reactive Oxygen Species)
TLR4 - Recetor Toll-like 4 (do inglês: Toll-like receptor 4)
TNF-α - Fator de Necrose Tumoral-alfa (do inglês: Tumor Necrosis Factor-alpha)

I. INTRODUÇÃO

A doença periodontal, que inclui várias condições afetando os tecidos periodontais e resultando na perda de inserção e na deterioração do osso alveolar, vai além da periodontite. A identificação precisa dessas condições requer um diagnóstico preciso. Cada bactéria desempenha papéis distintos e cruciais na perda óssea ao redor dos dentes, com a disbiose dependendo das interações cooperativas e competitivas entre micróbios orais na formação do biofilme patogênico na gengiva (Kinane et al., 2017).

O desenvolvimento da periodontite nos indivíduos parece depender significativamente da resposta à sua microflora. Assim, os factores genéticos influenciam a forma como os indivíduos se relacionam com vários elementos ambientais, como o biofilme, afetando a sua suscetibilidade à periodontite. É a combinação de influências genéticas e ambientais, e não apenas a genética, que molda o resultado final. Considerando esta caraterística inerente, as escolhas de estilo de vida contribuem significativamente para o aparecimento da doença (Hajishengallis et al., 2020; Shaddox et al., 2020).

É crucial salientar que as doenças periodontais parecem ser desencadeadas por um grupo relativamente pequeno de agentes patogénicos periodontais. Os agentes patogénicos periodontais conhecidos constituem apenas uma fração das espécies bacterianas capazes de colonizar as superfícies dentárias, tanto acima como abaixo da margem gengival, bem como as membranas mucosas orais (Hajishengallis et al., 2020; Lee et al., 2020).

Bactérias específicas desencadeiam uma resposta imunitária num hospedeiro suscetível. A resposta do hospedeiro à infeção flutua com base nos atributos e na força do agente patogénico, bem como nas diferentes espécies bacterianas presentes, certas espécies podem ser predominantes durante a periodontite (Balta et al., 2021).

Pensa-se que a disseminação de microrganismos e dos seus subprodutos na placa dentária, juntamente com mediadores inflamatórios dos tecidos periodontais, para outros

órgãos do corpo é responsável por esta ligação entre as doenças periodontais e sistémicas (Nazir et al., 2020).

A microbiota periodontal é particularmente heterogénea, tendo sido descritas mais de 400 espécies só neste *habitat*, utilizando uma abordagem de amplificação, clonagem e sequenciação Sanger do 16S ácido ribonucléico ribossomal (16S rRNA). Os biofilmes encontrados nas superfícies supra e subgengivais dos dentes são constituídos por comunidades microbianas complexas que se adaptaram para prosperar nestes ambientes orais únicos. A análise da sequência do ARN ribossómico 16S destaca-se como um dos métodos de investigação mais recentes e potentes. Tal deve-se à ocorrência generalizada do gene 16S rRNA em todas as bactérias, à sua versatilidade para identificar todas as espécies de uma amostra ou géneros específicos e à sua eficiência em termos de rapidez e custo (Mira et al., 2017; Arredondo et al., 2023).

II. DESENVOLVIMENTO

1. A microbiota oral

A microbiota oral é uma comunidade complexa e dinâmica de microrganismos que residem na cavidade oral, incluindo bactérias, vírus, fungos e protozoários. Esta microbiota desempenha um papel crucial na manutenção da saúde oral e está envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos. A composição da microbiota oral pode variar significativamente entre indivíduos e é influenciada por factores como a dieta, a higiene oral e a saúde sistémica geral. A compreensão da microbiota oral é essencial para esclarecer o seu papel nas doenças orais, nomeadamente nas doenças periodontais. A cavidade oral alberga uma das comunidades microbianas mais diversas do corpo humano e a composição desta microbiota é fundamental para a manutenção da saúde oral (Li et al., 2022).

Num estado saudável, o microbioma oral mantém uma relação equilibrada e homeostática com o seu hospedeiro, contribuindo para um ambiente oral estável. Este equilíbrio evita a colonização de microrganismos patogénicos e apoia a saúde oral geral. Por exemplo, certas bactérias do microbioma oral, como as do género *Streptococcus*, produzem bacteriocinas que inibem o crescimento de bactérias Gram-negativo nocivas, protegendo assim a cavidade oral de potenciais infeções e mantendo a harmonia microbiana (Giordano-Kelhoffer et al., 2022).

O microbioma oral pode interagir com órgãos distantes através da corrente sanguínea ou do trato digestivo, influenciando a saúde sistémica. Por exemplo, foram detetadas bactérias da cavidade oral no coração, pulmões e cérebro, onde podem contribuir para vários processos de doença. Isto destaca o papel crucial que o microbioma oral desempenha não apenas na manutenção da saúde oral, mas também na potencial influência na saúde sistémica global. Compreender a composição e as funções do microbioma oral, bem como os factores que levam à disbiose, é essencial para desenvolver estratégias preventivas e terapêuticas para uma ampla gama de condições de saúde (Giordano-Kelhoffer et al., 2022; Nazir et al., 2020).

1.1. Sequenciação

A sequenciação da microbiota oral avançou significativamente nos últimos anos, principalmente devido ao desenvolvimento das tecnologias de sequenciação de nova geração (NGS). Estas inovações permitiram aos investigadores analisar as complexas comunidades microbianas na cavidade oral com um detalhe e precisão sem precedentes, elucidando interações complexas entre estas comunidades e a saúde do hospedeiro. Estudos recentes utilizaram tecnologias de sequenciação de alto rendimento, particularmente a sequenciação do gene do RNA ribossomal 16S, para analisar a diversidade microbiana na cavidade oral sob várias condições de saúde. Este método oferece uma compreensão mais abrangente do microbioma oral em comparação com as técnicas tradicionais de cultivo, que são limitadas na capacidade de captar a gama completa de espécies microbianas presentes no ambiente oral (Gu et al., 2019; Arredondo et al., 2023; Johnson et al., 2019).

Esta abordagem fornece informações não apenas sobre a composição da microbiota, mas também sobre o seu potencial funcional. Por exemplo, estudos metagenómicos descobriram diferenças nas comunidades microbianas entre a saúde periodontal e a doença periodontal, identificando assinaturas microbianas específicas que se correlacionam com os resultados clínicos. Esta compreensão mais profunda tanto da composição quanto da função microbiana oferece novas oportunidades para diagnosticar e tratar condições periodontais (Arredondo et al., 2023; Kang et al., 2021).

O uso de ferramentas de bioinformática melhorou a análise dos dados de sequenciação, permitindo a identificação de espécies microbianas e suas abundâncias relativas em várias populações e condições de saúde. Por exemplo, uma revisão aprofundada da microbiota subgengival destacou perfis microbianos distintos em indivíduos saudáveis em comparação com aqueles com gengivite ou periodontite, enfatizando a importância da dinâmica das comunidades microbianas na doença periodontal (Abusleme et al., 2021; Arredondo et al., 2023).

Este nível de detalhe é essencial para criar estratégias terapêuticas direcionadas para restaurar um microbioma saudável e prevenir a progressão da doença. Além da sequenciação do gene 16S rRNA, outros métodos, como a sequenciação shotgun, estão

sendo utilizados para obter uma compreensão mais profunda do microbioma oral. Estas técnicas permitem a investigação das interações microbianas, genes de resistência e vias metabólicas que podem influenciar os processos de doença (Kang et al., 2021).

1.1.1. Sequências OTU e ASV

1.1.1.1. Sequências OTU

Unidades Taxonómicas Operacionais (OTUs) são um método de classificação utilizado em ecologia microbiana para agrupar sequências estreitamente relacionadas. Tradicionalmente, as OTUs são definidas por agrupamento de sequências que compartilham uma similaridade acima de um limiar específico. Este método tem sido comummente empregado para estimar a diversidade de espécies dentro de comunidades microbianas (Callahan et al., 2017).

As sequências obtidas de amostras ambientais são agrupadas com base em sua similaridade, sendo um limiar (comummente 97%) normalmente usado para aproximar diferenças ao nível de espécies. Sequências que atendem ou excedem este limiar são agrupadas na mesma OTU, assumindo que representam a mesma espécie ou espécies estreitamente relacionadas. As OTUs servem como uma aproximação ou representação operacional de espécies microbianas, permitindo a comparação da diversidade microbiana entre amostras, através da contagem do número de OTUs únicos (Edgar, 2018; Callahan et al., 2017).

1.1.1.2. Sequências ASV

As variantes de sequência de amplicão (ASVs) oferecem uma abordagem mais precisa para analisar a diversidade microbiana. As ASVs são sequências exatas que foram corrigidas para erros de sequenciação, permitindo aos investigadores identificar as verdadeiras sequências biológicas numa amostra com maior precisão (Callahan et al., 2017).

Ao contrário das OTUs, este método não agrupa sequências, mas preserva cada variante de sequência única observada. As ASVs oferecem uma resolução mais alta do

que as OTUs, detectando até mesmo diferenças de um único nucleotídeo entre sequências, o que é essencial para identificar e distinguir táxons microbianos estreitamente relacionados (Callahan et al., 2016; Callahan et al., 2017).

ASVs permitem uma caracterização mais precisa das comunidades microbianas ao reter variantes de sequência que poderiam ser perdidas com métodos baseados em OTU. Após uma correção de erro minuciosa, ASVs fornecem dados mais precisos, oferecendo uma representação mais clara da verdadeira diversidade dentro da amostra (Callahan et al., 2017; Callahan et al., 2016).

1.1.2. Sequenciação 16S rRNA

O uso do gene 16S rRNA para sequenciação e classificação microbiana advém do trabalho inovador de Carl Woese na década de 1970. A pesquisa de Woese identificou um novo domínio da vida com a descoberta da archaea, transformando a nossa compreensão da árvore da vida. Ele adaptou as técnicas de sequenciação de Sanger para estudar o gene 16S rRNA, que é conservado em todas as formas de vida, mas possui regiões variáveis que ajudam a diferenciar espécies. Este método permitiu a Woese e seus colegas comparar sequências de uma ampla gama de organismos. Através dessas comparações, Woese descobriu que os metanógenos não se encaixavam nos grupos conhecidos de bactérias ou eucariotas, levando-o a propor o terceiro domínio da vida—Archaea. Esta descoberta, anunciada em 1977, foi inovadora e transformou a taxonomia microbiana e a filogenética (Albers et al., 2013; Woese & Fox, 1977).

A sequenciação do 16S rRNA continua a ser um método fundamental na ecologia microbiana, sistemática e diagnóstico clínico. Ele foca no gene 16S ribossomal RNA, uma parte do ribossoma procariótico que é altamente conservada entre espécies bacterianas e arquéias. Este gene possui nove regiões hipervariáveis ladeadas por sequências conservadas, tornando-o ideal para amplificação por reação em cadeia da polimerase (tPCR) e sequenciação para identificar e classificar microrganismos (Thompson et al., 2017).

As amostras são coletadas, e o ácido desoxirribonucleico (ADN) extraído inclui ADN microbiano, que é essencial para a sequenciação do 16S rRNA. A tPCR é utilizada

para amplificar o gene 16S rRNA, com primers universais projetados para alvos nas regiões conservadas que rodeiam as regiões variáveis. Dependendo dos objetivos do estudo, diferentes combinações de regiões variáveis são amplificadas, sendo V3-V4 um dos alvos mais frequente. Plataformas de sequenciação como o Illumina MiSeq são frequentemente usadas devido à sua precisão e alto rendimento, permitindo a sequenciação profundo de comunidades microbianas (Thompson et al., 2017; Arredondo et al., 2023).

Os dados de sequenciação passam por um controle de qualidade, que inclui o corte de leituras de baixa qualidade e a remoção de quimeras. As sequências são então agrupadas em OTUs ou analisadas como ASVs usando ferramentas como o DADA2. As sequências processadas são comparadas a bases de dados de referência como SILVA ou Greengenes para atribuir identidades taxonómicas (Johnson et al., 2019; Arredondo et al., 2023).

Avanços na tecnologia de sequenciação, especialmente o desenvolvimento de plataformas de leitura longa como PacBio e Oxford Nanopore, agora permitem a sequenciação do gene 16S rRNA em comprimento total. Este método oferece uma resolução mais alta para distinguir táxons estreitamente relacionados e demonstrou uma precisão melhorada na análise de comunidades microbianas em comparação com a sequenciação de leitura curta. A combinação da sequenciação do 16S rRNA com outras técnicas abordagens, como metagenómica, metatranscriptómica e metabolómica, ganhou popularidade. Esta abordagem integrativa fornece uma compreensão mais profunda das funções e interações microbianas (Knight et al., 2018; Johnson et al., 2019).

1.1.3. Sequenciação Shotgun

A sequenciação shotgun é uma técnica utilizada para sequenciar genomas inteiros ao fragmentar aleatoriamente o ADN em muitos pedaços pequenos, que são então sequenciados individualmente. O termo "shotgun" reflete a natureza aleatória e abrangente desta abordagem, semelhante à dispersão de um tiro de espingarda. Ao contrário dos métodos direcionados, como a sequenciação do 16S rRNA, a sequenciação shotgun permite a sequenciação de todo o ADN numa amostra, incluindo tanto regiões

codificadoras quanto não codificadoras, assim como os genomas de todos os organismos presentes numa comunidade microbiana mista (Quince et al., 2017).

Assim como com outros métodos de sequenciação, o processo começa com a coleta da amostra. O ADN é então extraído, garantindo que inclua todo o material genético na amostra, normalmente através de métodos químicos ou mecânicos para lisar células e libertar o seu ADN. O ADN extraído é quebrado aleatoriamente em fragmentos menores. Após a fragmentação, os fragmentos de ADN são preparados para a sequenciação ao anexar adaptadores às extremidades de cada fragmento. Estes adaptadores permitem que os fragmentos sejam reconhecidos pela plataforma de sequenciação e frequentemente contêm sequências necessárias para amplificação e sequenciação. A preparação da biblioteca pode também envolver amplificação por tPCR para aumentar a quantidade de ADN para a sequenciação, embora este passo às vezes seja minimizado para evitar viéses da amplificação. A biblioteca de ADN preparada é então sequenciada usando tecnologias de alto rendimento como Illumina, Pacific Biosciences ou Oxford Nanopore. Cada fragmento é sequenciado várias vezes para garantir a precisão, produzindo milhões a bilhões de sequências curtas, chamadas leituras (Quince et al., 2017; Gu et al., 2019).

As leituras curtas geradas pela sequenciação são então montadas em sequências mais longas usando ferramentas de bioinformática. Este processo, chamado montagem de sequências, envolve o alinhamento e sobreposição das leituras curtas para reconstruir o máximo possível do genoma original (Nayfach et al., 2021; Quince et al., 2017).

A contaminação por ADN externo pode tornar a interpretação dos dados mais desafiadora, particularmente em estudos metagenómicos. Protocolos e controlos rigorosos são essenciais para reduzir o risco de contaminação e manter a precisão dos resultados (Gu et al., 2019; Quince et al., 2017).

1.1.4. Composição

Com mais de 700 espécies bacterianas conhecidas, o microbioma oral é o segundo microbioma mais diverso no corpo humano. Estudos da última década demonstraram que, mesmo dentro de populações específicas, podem existir múltiplos padrões distintos de

composição do microbioma entre indivíduos em boa saúde geral. Projetos baseados em amostras de enxaguamento oral são bem adequados para examinar como o microbioma oral como um todo é influenciado por factores externos. Estes factores externos englobam uma ampla gama de variáveis, com algumas diretamente conectadas ao ambiente oral, como a água que bebemos e os alimentos que comemos (Rajasekaran et al., 2024; Willis & Gabaldon., 2020; Liu et al., 2024).

Numa coorte de 1319 amostras de adolescentes saudáveis em Espanha analisadas usando a sequenciação do 16S rRNA, foi encontrado que variações na composição iónica da água potável pública estavam associadas a mudanças na composição geral do microbioma oral. Amostras de regiões com maior alcalinidade e níveis elevados de iões como sulfato (SO_4^{2-}) e sódio (Na^+) apresentaram maiores abundâncias de géneros como *Porphyromonas* e *Flavobacterium*. Em contraste, regiões com níveis mais baixos de iões mostraram maiores abundâncias de géneros como *Veillonella*, *Pseudomonas* e *Ralstonia* (Willis & Gabaldon., 2020; Li et al., 2022).

Diferentes dietas também têm mostrado influenciar variações na composição do microbioma. Embora alimentos e água sejam factores claros de contribuição, muitos outros factores também podem afetar o microbioma (Willis & Gabaldon., 2020).

O microbioma oral é um ecossistema diverso que inclui uma ampla gama de filos bacterianos, como *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydia*, *Euryarchaeota*, *Fusobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* e *Tenericutes*. Além disso, a cavidade oral contém filos e candidatas menos conhecidos, incluindo *Chloroflexi*, *Chlorobi*, *GN02*, *Synergistetes*, *SR1*, *TM7* e *WPS-2*. Entre estes, *GN02*, *SR1* e *TM7* são membros da adiação dos candidate phyla radiação (CPR). Acredita-se que os membros do CPR oral influenciem a ecologia microbiana oral ao modular a estrutura e função do microbioma oral, o que tem sido associado a doenças orais como periodontite e halitose (Tabela 1) (Rajasekaran et al., 2024; Li et al., 2022).

Tabela 1 - A composição do microbioma oral (Adaptado de Rajasekaran et al., 2024).

Componente Microbiano	Filos/Gêneros Predominantes	Outros Géneros Notáveis
Bactérias	*Actinobacteria, Bacteroidetes, Chlamydia, Euryarchaeota, Fusobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes, e Tenericutes*	- Cocos gram-positivos: *Abiotrophia, Peptostreptococcus, Streptococcus, e Stomatococcus* - Bacilos gram-positivos: *Actinomyces, Bifidobacterium, Corynebacterium, Eubacterium, Lactobacillus, Propionibacterium, Pseudoramibacter, e Rothia* - Cocos gram-negativos: *Moraxella, Neisseria, e Veillonella* - Bacilos gram-negativos: *Campylobacter, Capnocytophaga, Desulfobacter, Desulfovibrio, Eikenella, Fusobacterium, Hemophilus, Leptotrichia, Prevotella, Selemonas, Simonsiella, Treponema, e Wolinella*
Fungos	*Candida*	*Cladosporium, Aureobasidium, Saccharomycetales, Aspergillus, Fusarium, e Cryptococcus*
Arqueas	*Euryarchaeota*	-
Vírus Eucariótico	*Herpesviridae, Papillomaviridae, Anelloviridae, e Redondoviridae*	-
Bacteriófago	*Siphoviridae, Myoviridae, e Podoviridae*	-

Na cavidade oral saudável, os géneros bacterianos predominantes incluem tanto espécies Gram-positivo quanto Gram-negativo. Entre os cocos Gram-positivo, os géneros chave incluem *Abiotrophia*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus* e *Stomatococcus*. Notavelmente, certas espécies como *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus salivarius* são conhecidas por produzir compostos antimicrobianos, desempenhando um papel crucial na manutenção da saúde oral e na proteção contra a erosão do esmalte. No entanto, o escopo completo da função de cada bactéria neste ecossistema complexo ainda não é claro. Bastonetes Gram-positivo, incluindo *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Pseudoramibacter* e *Rothia*, também contribuem para a comunidade microbiana. Estudos recentes destacam *Actinomyces naeslundii* como um organismo dominante na placa dentária com influência significativa na ecologia da placa. Além disso, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Weissella* são reconhecidos como probióticos benéficos no tratamento de doenças periodontais, promovendo a saúde oral e melhorando os cuidados orais em geral (Rajasekaran et al., 2024).

Além dos táxons Gram-positivo, os géneros de cocos Gram-negativo *Moraxella*, *Neisseria* e *Veillonella* são residentes proeminentes da cavidade oral saudável. Entre os bastonetes Gram-negativo, os géneros comummente observados incluem *Campylobacter*,

Capnocytophaga, *Desulfobacter*, *Desulfovibrio*, *Eikenella*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Selemonas*, *Simonsiella*, *Treponema* e *Wolinella*. Muitas bactérias orais são reconhecidas pela sua capacidade de formar biofilmes. *Fusobacterium nucleatum* exemplifica isso através de seu papel em facilitar a coagregação intergéneros dentro dos biofilmes orais, reunindo diversas bactérias para formar uma comunidade estruturada. O *F. nucleatum* também desempenha um papel crucial no crescimento e desenvolvimento desses biofilmes. Dentro dos biofilmes, as espécies de *Prevotella* têm uma função distinta, pois podem regular a residência do hospedeiro e as respostas das células imunes sem necessidade de contato direto com o hospedeiro (Rajasekaran et al., 2024).

Os fungos constituem aproximadamente 0,004% dos microrganismos orais totais e foram detectados principalmente em amostras do palato duro, placa supragengival e enxaguamentos orais, provavelmente devido às características dos participantes e à baixa prevalência de fungos em outras áreas. No entanto, estudos recentes encontraram uma ampla gama de fungos em amostras de saliva e identificaram dois tipos distintos de comunidades a nível de género. Espécies de *Candida* são os fungos mais comummente observados na cavidade oral. Outros fungos relevantes presentes incluem espécies dos grupos *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomycetales*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Cryptococcus*. Quando a defesa imune do hospedeiro está comprometida, os fungos no microbioma oral podem modular as respostas imunes ou até tornam-se patogénios oportunistas. Os fungos também interagem fisicamente com as bactérias na cavidade oral, com *Candida* e outros fungos servindo como organismos de ponte que facilitam a adesão bacteriana às suas superfícies e às células epiteliais. Isso resulta em diferentes comunidades bacterianas aderindo a células cobertas por *Candida* em comparação com células não cobertas. Vale a pena notar que as espécies de fungos mostram alta variabilidade entre indivíduos em amostras de enxágue oral de pessoas saudáveis (Li et al., 2022; Rajasekaran et al., 2024).

Os arqueias orais estão presentes em muito menor abundância e diversidade em comparação com as bactérias orais. Embora se acreditasse inicialmente que os arqueias fossem apenas metanogénicos na cavidade oral, muitos estudos identificaram também sequências de ADN de arqueias não metanogénicas. Todas as espécies conhecidas de arqueias orais pertencem ao filo *Euryarchaeota*. Pesquisas sugerem que esses arqueias

são encontrados em maiores quantidades em indivíduos com periodontite (Rajasekaran et al., 2024; Li et al., 2022).

Além dos três domínios principais da vida, o microbioma oral também inclui vírus. O microbioma oral contém populações virais extensas, principalmente bacteriófagos que atacam espécies bacterianas específicas. Esses fagos podem existir tanto como partículas de fago livres quanto como profagos latentes integrados em lisogénicos bacterianos. A população de fagos é composta principalmente pelas famílias de *Caudovirus Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae*, embora o conhecimento sobre o fagoma periodontal ainda seja limitado. Vírus eucariotas comuns na cavidade oral de adultos saudáveis incluem *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Anelloviridae* e *Redondoviridae*. *Anelloviridae* são os mais comuns, seguidos pelos recentemente descobertos *Redondoviridae*. Propôs-se que vírus na saliva possam abrigar genes patogénicos no ambiente oral. O consenso atual sugere que os vírus orais são pessoais, persistentes e específicos para o género, com comunidades virais mostrando alta semelhança dentro dos mesmos ambientes (Rajasekaran et al., 2024; Li et al., 2022).

O *Human Microbiome Project* inicialmente levantou a questão sobre a existência de um microbioma humano central. Um "microbioma central" é definido como o conjunto de genes compartilhados presentes em um habitat específico em todos os humanos. Este conceito evoluiu para cinco categorias: o núcleo comum, o núcleo temporal, o núcleo ecológico, o núcleo funcional e o núcleo adaptado ao hospedeiro. Essas categorias são baseadas na distribuição espacial, estabilidade temporal, impacto ecológico e seus efeitos nas funções e saúde do hospedeiro. Assim, o microbioma central oral refere-se à coleção de microrganismos que colonizam a cavidade oral, juntamente com seus genomas, classificados de acordo com essas cinco definições centrais (Li et al., 2022).

Ainda não temos uma compreensão completa dos diversos equilíbrios microbianos potenciais que resultam em estomatótipos específicos, uma vez que os microbiomas saudáveis de muitas populações únicas ao redor do mundo permanecem inexplorados. Além disso, muitos estudos existentes carecem da resolução necessária para explicar as diferenças em pequena escala entre amostras. No entanto, estudos sugerem que os estomatótipos servem como um passo inicial útil na investigação da variação

subjacente entre amostras, que pode então ser examinada mais detalhadamente através da análise de alterações em organismos específicos (Willis & Gabaldon., 2020).

A microbiota oral varia entre diferentes nichos orais e muda dinâmicamente ao longo das etapas da vida. Por exemplo, uma análise de amostras de saliva, placa supragengival e mucosa oral de indivíduos saudáveis em diferentes idades e estádios de dentição mostrou que a cavidade oral é um sistema ecológico altamente heterogéneo, com nichos distintos abrigando comunidades microbianas significativamente diferentes. Isso sugere que a microbiota oral central deve ser definida com base na etapa da vida do hospedeiro e no nicho ecológico específico dentro da cavidade oral (Li et al., 2022).

1.1.5. Influência dos nichos orais

Para investigar a composição da microbiota oral em diferentes nichos orais e entender como esses nichos afetam a estrutura e a composição da microbiota, a cavidade oral é tipicamente dividida em vários locais de amostragem. Estes incluem saliva, as superfícies duras dos dentes e as superfícies de tecidos moles da língua, mucosa bucal, palato e gengiva (Aas et al., 2005; Li et al., 2022).

<u>Saliva</u>

A composição microbiana da saliva inclui microrganismos provenientes de vários nichos orais, tornando a saliva um reservatório da microbiota oral e uma impressão digital do microbioma oral geral. No entanto, estudos recentes mostraram que o microbioma salivar não representa totalmente o microbioma oral completo e é menos representativo do que o microbioma encontrado na placa supragengival. Por exemplo, *Firmicutes* são mais abundantes na saliva, enquanto *Actinobacteria* e *Fusobacteria* são mais prevalentes na placa dentária. Análises adicionais demonstraram que amostras de fluido de enxaguamento oral são mais representativas da microbiota específica do local do que a saliva (Rajasekaran et al., 2024; Li et al., 2022).

Acredita-se que a saliva tenha um impacto significativo na colonização e na eliminação de microrganismos e desempenhe papéis cruciais nas defesas físicas, químicas e imunológicas da cavidade oral. Ela contribui para a formação de uma camada líquida protetora chamada película adquirida, que está envolvida na adesão e colonização

microbiana. Além disso, a saliva contém várias proteínas de defesa que contribuem para a imunidade da mucosa oral, incluindo imunoglobulinas salivares, péptidos antimicrobianos, lisozima, α-amilase, mucina, peroxidases e estaterina (Li et al., 2022).

Superfícies dentárias

A superfície do dente, sendo a única superfície não descamativa na cavidade oral, oferece um ambiente ideal para o crescimento bacteriano e o desenvolvimento da placa dentária. Estudos mostram que a placa dentária apresenta maior diversidade, riqueza microbiana e uniformidade em comparação com amostras de saliva e língua. É notável que a placa na superfície do esmalte supragengival se forma a partir da película adquirida, enquanto nos locais subgengivais, o fluido crevicular gengival (FCG) serve como uma fonte nutricional única, com suas proteínas séricas combinando-se com proteínas salivares para formar um filme proteico distinto. Além disso, a barreira física proporcionada pela gengiva reduz a tensão de oxigénio e as forças de cisalhamento nos locais subgengivais, levando a diferenças na composição e estrutura das microbiotas de placa supragengival e subgengival. Por exemplo, bactérias anaeróbicas como *Actinomyces*, *Fusobacterium* e *Veillonella* são mais prevalentes na placa subgengival (Li et al., 2022; Bertolini et al., 2022).

Superfícies de tecidos moles

As características estruturais da camada epitelial da mucosa oral resultam na sua contínua descamação. Embora microrganismos orais colonizem as superfícies mucosas, sua colonização é relativamente limitada. *Streptococcus* é o género mais abundante encontrado nos tecidos mucosos. Notavelmente, a língua abriga uma densidade e uma diversidade maiores de microrganismos em comparação com outras superfícies mucosas. Anaeróbios facultativos e obrigatórios, como *Actinomyces*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Streptococcus* e *Veillonella*, são os principais microrganismos encontrados na camada da língua, provavelmente devido ao ambiente anaeróbico proporcionado pelas papilas da língua. Além disso, *Haemophilus*, *Leptotrichia* e *Neisseria* também são abundantes nas amostras recolhidas a partir da língua. O sistema imunológico da mucosa oral, como parte da defesa imunológica geral do corpo, influencia ainda mais a composição dos microrganismos orais (Li et al., 2022).

Devido os factores como fluxo salivar, mastigação e outros, diferentes locais na cavidade oral possuem propriedades físico-químicas variadas, como disponibilidade de nutrientes, pH, tensão de oxigénio e forças de cisalhamento, que selecionam microrganismos adequados para cada nicho. Consequentemente, esses nichos orais exibem composições distintas de microbiota oral. Além disso, nichos orais como a língua e os dentes fornecem suporte físico para a formação de biofilmes microbianos orais (Li et al., 2022).

1.2. Principais alterações na composição durante a periodontite

Aumento de bactérias patogénicas

A periodontite é caracterizada por uma alteração significativa na microbiota oral, marcada por um aumento na abundância de bactérias patogénicas que promovem a progressão da doença. Esta mudança frequentemente inclui a proliferação de patogénios-chave específicos, que são cruciais para desencadear e sustentar os processos inflamatórios associados à periodontite (Hajishengallis & Korostoff., 2017; Jasma & Sánchez, 2019).

Porphyromonas gingivalis: A *P. gingivalis* é amplamente reconhecida como um fator chave no desenvolvimento e progressão da periodontite. Tem a capacidade única de subverter a resposta imune do hospedeiro, promovendo um ambiente disbiótico que apoia a sua sobrevivência e a proliferação de outros microrganismos patogénicos. *P. gingivalis* usa vários factores de virulência, incluindo as gingipainas (enzimas proteolíticas que degradam tecidos e componentes imunes do hospedeiro) promovendo assim inflamação e destruição tecidual, que são marcas características da periodontite. Além disso, *P. gingivalis* manipula o sistema imune do hospedeiro ao alterar a produção de citocinas, prejudicando a capacidade do corpo de eliminar infecções e permitindo que a inflamação crónica persista (Mulhall et al., 2020; Sochalska & Petompa, 2017).

Tannerella forsythia: *T. forsythia* é um outro patogénio chave associado à periodontite e frequentemente encontrado juntamente com *P. gingivalis* como parte do "complexo vermelho" de bactérias, que está fortemente ligado a doenças periodontais severas. *T. forsythia* contribui para o desenvolvimento da periodontite ao promover inflamação e auxiliar na formação de biofilmes complexos que resistem à resposta

imunológica do hospedeiro e aos tratamentos periodontais convencionais. Esta bactéria produz vários factores de virulência, incluindo BspA, um antigénio de superfície que interage com os tecidos do hospedeiro para melhorar a adesão e invasão bacteriana, agravando assim a inflamação periodontal e a destruição tecidual (Schäffer & Andrukhov, 2024).

Treponema denticola: A espiriloqueta *T. denticola* é altamente prevalente em bolsas periodontais durante a periodontite e é especialmente hábil em invadir os tecidos periodontais. Sua motilidade e capacidade de evadir o sistema imunológico do hospedeiro a tornam um patogénio potente no ambiente periodontal. *T. denticola* produz enzimas proteolíticas, como a dentilisina, que degradam componentes da matriz extracelular e perturbam junções intercelulares, auxiliando na invasão tecidual. Além disso, *T. denticola* prejudica as respostas imunológicas do hospedeiro ao modular a produção de citocinas e diminuir a função dos neutrófilos, contribuindo ainda mais para a natureza crónica da periodontite (Kikuchi & Ishihara, 2020).

Redução de bactérias benéficas

Numa cavidade oral saudável, o microbioma é composto principalmente por bactérias comensais que promovem a saúde oral ao manter o equilíbrio microbiano e inibir o crescimento de espécies patogénicas. Bactérias benéficas, como algumas espécies dos géneros *Streptococcus* (por exemplo, *Streptococcus dentisani*) e *Actinomyces*, desempenham papéis fundamentais na preservação da integridade da mucosa oral e na prevenção da colonização por bactérias nocivas. No entanto, durante a periodontite, a abundância relativa desses comensais benéficos diminui significativamente. Essa redução perturba o equilíbrio microbiano, criando um ambiente mais favorável para que as bactérias patogénicas prosperem, um fenómeno conhecido como disbiose microbiana. Essa mudança é um fator principal no desenvolvimento e na progressão da doença periodontal. A perda de bactérias benéficas enfraquece as funções protetoras do microbioma oral, incluindo a produção de péptidos antimicrobianos e a imunidade da mucosa, permitindo que as bactérias patogénicas dominem e agravem a doença (Lamont & Koo, 2019; Rajasekaran et al., 2024).

Aumento de bactérias anaeróbias

As condições anaeróbicas nos bolsas periodontais criam um ambiente ideal para o crescimento de bactérias anaeróbias, que são centrais para a patogénese da periodontite (Lamont & Koo, 2019).

Fusobacterium nucleatum: *F. nucleatum* é um contribuinte chave para a formação e maturação dos biofilmes periodontais. É conhecido por sua capacidade de co-agregar com várias bactérias orais, atuando como um organismo de ligação que apoia o desenvolvimento de biofilmes complexos. Esses biofilmes são resistentes tanto à resposta imune do hospedeiro quanto aos tratamentos convencionais, complicando o manejo da periodontite. Além disso, *F. nucleatum* promove a inflamação na periodontite produzindo endotoxinas que desencadeiam a libertação de citocinas pró-inflamatórias, impulsionando ainda mais a destruição tecidual (Lamont & Koo, 2019; Li et al., 2022; Kozak & Pawlik., 2023).

Prevotella intermedia: Assim como *F. nucleatum*, *P. intermedia* prospera no ambiente anaeróbico dos espaços periodontais e está comummente associada à periodontite. Esta bactéria desempenha um papel na degradação dos tecidos do hospedeiro e na continuidade da inflamação. *P. intermedia* produz proteases e outros factores de virulência que degradam proteínas do hospedeiro, fornecendo nutrientes para o crescimento bacteriano e contribuindo para a destruição tecidual observada na periodontite (Kwack et al., 2022).

Alteração na diversidade microbiana

Uma característica marcante da periodontite é a redução na diversidade microbiana geral dentro da cavidade oral. Num estado saudável, o microbioma oral consiste numa comunidade estável e diversificada de microrganismos que mantém o equilíbrio e previne o crescimento excessivo de espécies patogénicas. No entanto, durante a periodontite, essa diversidade é significativamente diminuída, com a comunidade microbiana sendo dominada por algumas espécies patogénicas. Essa redução na diversidade é um fator-chave na transição da saúde para a doença, pois a perda do equilíbrio microbiano cria um ambiente onde bactérias patogénicas podem prosperar. A diminuição da diversidade geralmente é acompanhada por um aumento na abundância de

patogénios específicos, promovendo ainda mais a disbiose e a progressão da doença periodontal (Lamont & Koo, 2019; Willis & Gabaldón, 2020).

Dinâmica do biofilme

A dinâmica da formação e composição do biofilme é crucial para a patogénese da periodontite. Em um estado saudável, os biofilmes orais são dominados por microrganismos comensais que ajudam a manter um ecossistema microbiano equilibrado. No entanto, na periodontite, a composição desses biofilmes muda significativamente, sendo dominada por espécies patogénicas que impulsionam a inflamação e a destruição dos tecidos. Essa mudança não só acelera a progressão da doença, mas também complica o tratamento, pois os biofilmes patogénicos são altamente resistentes às defesas imunes do hospedeiro e às terapias periodontais convencionais. A presença de biofilmes complexos e multi-específicos na periodontite cria um ambiente protetor para as bactérias patogénicas, permitindo-lhes persistir nas bolsas periodontais apesar do tratamento. A resiliência desses biofilmes é um fator-chave na natureza crónica e recidivante da periodontite (Lamont & Koo, 2019).

1.3. Reacções do microbioma na periodontite

Alteração no metabolismo de glúcidos

Em um ambiente oral saudável, as bactérias comensais metabolizam glúcidos através da glicólise, gerando quantidades moderadas de ácido lático. No entanto, sob condições disbióticas, especialmente com a alta ingestão de açúcares, bactérias acidogénicas como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp*. tornam-se dominantes. Essas bactérias possuem uma capacidade aumentada para fermentar açúcares, resultando em produção excessiva de ácido lático (Abranches et al., 2018).

A glicólise é um processo enzimático de dez etapas que converte uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato, produzindo energia sob a forma de ATP e NADH (Figura 1). O processo começa com a fosforilação da glicose, aprisionando-a dentro da célula. Segue-se uma série de reações que dividem a molécula de glicose em dois compostos de três carbonos. Estes compostos são então processados para gerar ATP e NADH, que são cruciais para a energia celular. A glicólise culmina na formação de piruvato (Bar-Even et al., 2012).

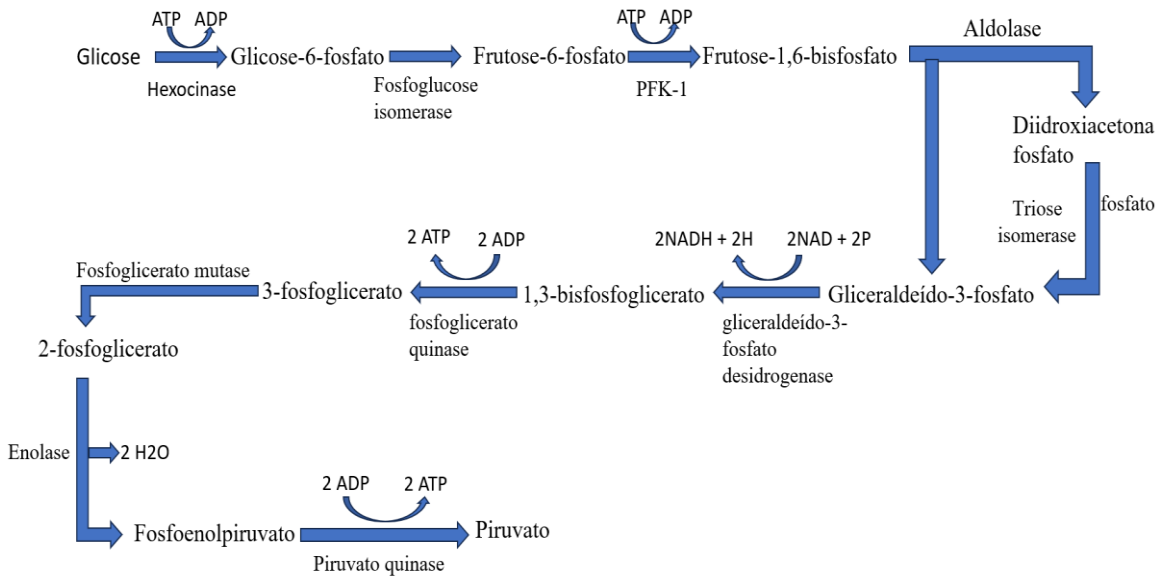

Figura 1- Glicólise (Adaptado de Bar-Even et al., 2012).

O ambiente acidogénico resultante reduz o pH da placa dentária para abaixo de 5,5, o que é crucial porque desencadeia a desmineralização do esmalte, um processo diretamente associado ao desenvolvimento de cáries dentárias. Além disso, as condições ácidas favorecem seletivamente espécies tolerantes ao ácido, agravando o estado disbiótico. O ácido também perturba o equilíbrio ecológico ao inibir o crescimento de bactérias comensais benéficas, criando um ciclo de retroalimentação que perpetua a disbiose (Abranches et al., 2018).

Proteólise e Metabolismo de Aminoácidos

Porphyromonas gingivalis produz gingipainas, um grupo de proteases de cisteína que degradam proteínas estruturais do hospedeiro, como colagénio, laminina e fibronectina (Hočevar et al., 2020).

O processo de ligação do substrato e catálise pela enzima gingipaina começa quando um substrato polipeptídico, contendo geralmente um resíduo de arginina ou lisina, se liga ao sítio ativo da enzima. O grupo tiol de um resíduo de cisteína é ativado e ataca a ligação peptídica do substrato, resultando na sua clivagem. A enzima forma um intermediário, ligando-se temporariamente a parte do substrato. Posteriormente, uma molécula de água é ativada para atacar esse intermediário, separando a enzima do fragmento peptídico restante. Com a libertação do fragmento, a enzima é regenerada e pronta para catalisar outro ciclo de proteólise (Figura 2) (Yongqing et al., 2011).

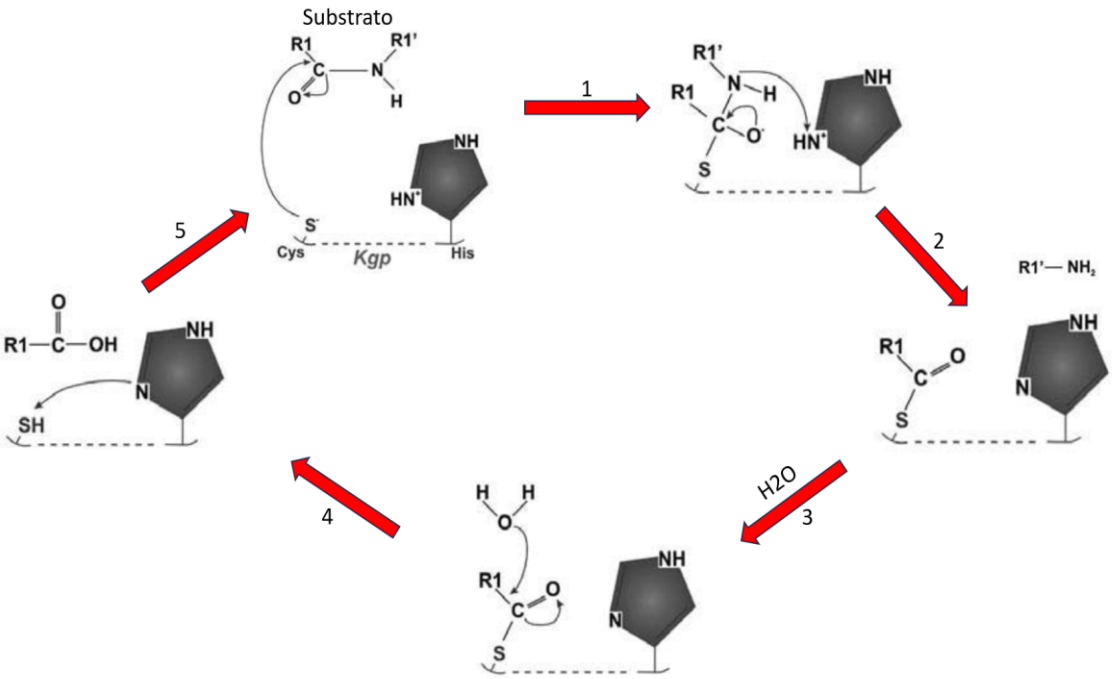

Figura 2- O mecanismo catalítico das proteases de cisteína (Adaptado de Yongqing et al., 2011).

Essa atividade proteolítica não apenas fornece nutrientes para o crescimento bacteriano, mas também compromete a integridade dos tecidos periodontais. Os gingipainas ainda perturbam as respostas imunes do hospedeiro ao degradar imunoglobulinas e proteínas do complemento, permitindo que *P. gingivalis* evite a resposta imune e perpetue a infeção (Hočevar et al., 2020).

Além disso, a proteólise das proteínas do hospedeiro leva à produção de compostos sulfurados voláteis (CSV), como sulfeto de hidrogénio e metil mercaptano, que contribuem para o odor característico da halitose e degradam ainda mais os tecidos. Esse processo não apenas fornece nutrientes para as bactérias patogénicas, mas também enfraquece a barreira epitelial, resultando em aumento da lesão tecidual e inflamação (Lee et al., 2023).

Metabolismo de Lípidos

As moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) produzidas por *P. gingivalis* são estruturalmente heterogéneas, particularmente em seus componentes lípido A e polissacarídeo. Essa variabilidade é crucial, pois permite que *P. gingivalis* evite a detecção pelo sistema imunológico do hospedeiro ou modifique a resposta imunológica. Por exemplo, *P. gingivalis* pode produzir LPS com diferentes estados de fosforilação ou

composições de ácidos gordos, alterando seu reconhecimento pelos receptores Toll-like, especialmente o recetor toll-like 4 (TLR4) (Olsen & Singhrao, 2018; Gui et al., 2015).

LPS possui três partes principais:

- Lípido A: É a âncora hidrofóbica que fixa o LPS na membrana bacteriana. O Lípido A é responsável por grande parte da atividade imunológica do LPS, sendo um potente estimulador da resposta inflamatória.

- Oligossacárido central: Conecta o Lípido A ao O-antígeno. Este núcleo pode ser modificado com vários açúcares e outros grupos químicos, o que influencia as propriedades imunológicas do LPS e sua capacidade de interagir com o sistema imunológico.

- O-antigen: É uma cadeia de polissacarídeos que se estende para fora do núcleo. Pode variar significativamente entre diferentes bactérias e até entre diferentes cepas da mesma espécie, contribuindo para a diversidade antigênica e a capacidade do LPS de evadir a resposta imune do hospedeiro (Simpson & Trent, 2019).

Duas modificações principais incluem a fosforilação e a composição dos ácidos gordos. A estrutura do Lípido A geralmente contém grupos fosfato ligados à estrutura de açúcares. Esses grupos fosfato são cruciais para a interação com o TLR4. Alterações no número e na posição desses grupos fosfato podem modificar a carga e a estrutura da molécula, afetando o quão bem o TLR4 pode reconhecer e se ligar ao LPS. O comprimento e o nível de saturação desses ácidos gordos podem variar. Essas variações podem mudar a hidrofobicidade geral e a conformação estrutural do Lípido A, o que pode influenciar como ele interage com o TLR4 (Simpson & Trent, 2019; Olsen & Singhrao, 2018).

Algumas variantes do LPS de *P. gingivalis* podem ativar o TLR4 de forma fraca ou até inibir a sinalização mediada pelo TLR4, o que reduz a resposta inflamatória do hospedeiro. Essa modulação imunológica desvia a resposta do hospedeiro para uma inflamação crónica e de baixo grau, promovendo a sobrevivência bacteriana e a manutenção de um ambiente disbiótico (Simpson & Trent, 2019; Olsen & Singhrao, 2018).

Stress Oxidativo e Produção de ROS

Em condições disbióticas, há um aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigénio (ROS) tanto pelas células imunes do hospedeiro quanto pelas próprias bactérias patogénicas. *Fusobacterium nucleatum*, por exemplo, demonstrou induzir a produção de ROS ao ativar a NADPH oxidase nas células do hospedeiro, levando ao stress oxidativo. Esse stress danifica os tecidos periodontais, exacerbando a resposta inflamatória e facilitando a progressão da doença periodontal (Giannopoulou et al., 2008).

Alguns patogénios orais evoluíram de forma a desenvolver mecanismos para se proteger contra ROS. Por exemplo, *P. gingivalis* produz enzimas antioxidantes como a superoxido dismutase, que neutralizam ROS, permitindo que as bactérias sobrevivam no ambiente inflamatório das bolsas periodontais. A superoxido dismutase é responsável por catalisar a dismutação do anião superóxido, que é um ROS comum, em oxigénio molecular e peróxido de hidrogénio. Embora o peróxido de hidrogénio também seja um ROS, ele é eliminado por outras enzimas antioxidantes, como a catalase e a glutationa peroxidase, que o convertem em água e oxigénio, reduzindo assim o stress oxidativo. O equilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos de defesa bacteriana é crucial para determinar a extensão de lesão tecidual e a progressão da disbiose (Henry et al., 2014; Giannopoulou et al., 2008).

Alteração nas Vias do Óxido Nítrico

Bactérias orais, como *Veillonella* e *Actinomyces spp*, podem reduzir nitrato a nitrito, que é então convertido em óxido nítrico (NO) na cavidade oral. O nitrato ingerido (NO_3^-), principalmente derivado de fontes alimentares como vegetais folhosos, é secretado na saliva. Certas bactérias orais, incluindo *Veillonella* e *Actinomyces*, possuem enzimas nitrato redutase que catalisam a redução de nitrato a nitrito (NO_2^-) na cavidade oral. Uma vez formado o nitrito, ele pode ser reduzido a óxido nítrico (NO) através de várias vias. Na cavidade oral, isso ocorre principalmente em condições ácidas, particularmente no microambiente da língua, onde as bactérias atuam. O nitrito também pode entrar na corrente sanguínea e ser convertido em NO em outros tecidos do corpo. Essa via entero-salivar de nitrato-nitrito-NO desempenha um papel importante na manutenção dos níveis de NO no corpo, o que é essencial para a regulação da pressão arterial e a saúde cardiovascular (Bryan & Petrosino, 2017).

Enquanto o NO desempenha um papel na vasodilatação e na manutenção da saúde da mucosa, sua produção desregulada durante a disbiose pode levar a uma vasodilatação excessiva, aumento do fluxo de FCG e intensificação das respostas inflamatórias. Isso pode criar um ambiente mais permissivo para que bactérias patogênicas invadam e colonizem (Wang et al., 2019; Bryan & Petrosino, 2017).

Produção de Amónia

Certas bactérias orais, como *Streptococcus salivarius*, são capazes de produzir alcalino através da degradação da ureia pela ação da urease. Este processo enzimático gera amónia, que ajuda a neutralizar os ácidos no ambiente oral e desempenha um papel fundamental na manutenção do equilíbrio do pH. Ao aumentar o pH local, *S. salivarius* e outras bactérias que expressam urease contribuem para um ambiente que inibe espécies acidogénicas e promove a estabilidade da comunidade microbiana oral. No entanto, perturbações neste equilíbrio podem levar à disbiose, o que pode favorecer o crescimento de espécies patogénicas associadas a doenças periodontais (Abranches et al., 2018).

Sensores de Quórum

As bactérias orais comunicam-se através de detecção de quorum, utilizando moléculas sinalizadoras como o autoindutor-2 para coordenar comportamentos grupais, incluindo a formação de biofilmes e a expressão de factores de virulência. *Streptococcus mutans* usa a detecção de quorum para regular a produção de bacteriocinas e polissacarídeos extracelulares, que são cruciais para o desenvolvimento de biofilmes e a competitividade dentro da comunidade microbiana. A interrupção das vias de detecção de quorum tem sido explorada como uma estratégia terapêutica para prevenir a formação de biofilmes e controlar a disbiose (Jiang et al., 2019).

Metabolismo das Poliaminas

As poliaminas, como a putrescina, cadaverina, espermidina e espermina, são produzidas por bactérias através da descarboxilação de aminoácidos. Estas moléculas desempenham um papel crucial na estabilidade do biofilme bacteriano e estão associadas à persistência dos biofilmes na doença periodontal. Níveis elevados de poliaminas são frequentemente detetados na doença periodontal, onde contribuem para o crescimento bacteriano, comunicação celular e formação de biofilmes. A sua produção está ligada aos processos inflamatórios e à modulação da resposta imunitária que ocorrem durante a

periodontite, tornando-as potenciais biomarcadores da progressão e gravidade da doença (Amin et al., 2021).

Aquisição de Ferro

Bactérias patogênicas, como *Porphyromonas gingivalis*, desenvolveram mecanismos sofisticados para adquirir ferro, essencial para sua sobrevivência e virulência, especialmente no ambiente limitado em ferro do hospedeiro humano. Essas bactérias produzem sideróforos, que são pequenas moléculas de alta afinidade que quelam o ferro. Após os sideróforos se ligarem ao ferro, o complexo é transportado de volta para a célula bacteriana através de receptores específicos. Essa aquisição de ferro é essencial para a cadeia de transporte de electrões bacteriana e outros processos metabólicos (Zygiel & Nolan, 2018; Cassat & Skaar, 2013).

Além de facilitar a aquisição de ferro, os sideróforos e outros mecanismos de captura de ferro podem ajudar as bactérias a escapar do sistema imunológico do hospedeiro. Ao capturar o ferro, esses patogénios impedem que ele esteja disponível para as células imunológicas, que precisam de ferro para produzir ROS durante o choque oxidativo. Isso não só suporta a sobrevivência bacteriana, mas também reduz a capacidade do hospedeiro de eliminar a infecção, perpetuando o estado disbiótico e contribuindo para a inflamação crónica (Cassat & Skaar, 2013).

2. Doença periodontal

2.1. Definição

A periodontite é uma condição que compromete os tecidos de suporte dos dentes (Nazir et al., 2020).

A doença periodontal é um grupo de condições frequentemente apresentadas como gengivite, caracterizadas por hemorragia, inflamação das gengivas e dor, que podem levar à perda de aderência dos dentes e à destruição do osso alveolar se não forem tratadas. Em geral, a doença periodontal leva à perda de dentes, embora não de forma sistemática em todos os pacientes (WHO, 2018).

Práticas de higiene oral insuficientes são um fator importante no início e na progressão das doenças periodontais. Métodos incorretos de higiene oral podem resultar na acumulação de bactérias e placa bacteriana nos dentes, desencadeando gengivite e potencialmente evoluindo para periodontite (Sälzer et al., 2020).

Trata-se de doenças complexas com múltiplos factores em jogo, envolvendo uma interação complexa entre a microbiota subgengival, as respostas imunitárias e inflamatórias do hospedeiro e os factores ambientais que as influenciam (Zheng et al., 2020).

A periodontite ocorre quando a condição periodontal evolui de uma gengivite para um estado crónico, destrutivo e irreversível de doença inflamatória (Gasner & Schure, 2023).

A periodontite progride gradualmente com a acumulação de placa dentária, desequilíbrio bacteriano, aparecimento de bolsas periodontais, recessão gengival, danos nos tecidos e perda de osso alveolar, podendo resultar na perda de dentes (Michaud et al., 2017).

Uma higiene oral insuficiente permite que os organismos anaeróbios, que impulsionam o avanço das doenças periodontais, estabeleçam colónias em regiões mais profundas do periodonto, onde podem levar a cabo as suas atividades destrutivas (How et al., 2016).

Uma vez que estes organismos penetram profundamente no periodonto, induzem a inflamação, provocando a libertação de mediadores inflamatórios e outras substâncias de defesa do hospedeiro (Prasad et al., 2019).

2.2. Fisiopatologia

2.2.1. Hipótese da placa não específica

A hipótese da placa bacteriana não específica propõe que a patogenicidade da placa bacteriana é determinada pela quantidade de placa bacteriana e não pelas bactérias

específicas que esta contém. Isto sugere que nenhuma espécie bacteriana tem maior importância do que outra na sua capacidade de induzir a doença periodontal (Abdulkareem et al., 2023; Lavigne, 2023).

Esta hipótese teve origem no século XX, quando os cientistas levantaram a hipótese de que a doença periodontal poderia estar associada a alguma deficiência inerente à constituição do indivíduo (Lavigne, 2023).

A hipótese postula que, uma vez que todos os tipos de placa bacteriana apresentam um risco igual de causar doenças, a estratégia ideal para a prevenção de doenças implicaria a remoção completa da placa bacteriana mecanicamente, através de métodos como a escovagem ou a palhagem dos dentes, independentemente das bactérias específicas presentes (Lavigne, 2023; Abdulkareem et al., 2023).

Em estudos transversais, existe frequentemente uma correlação robusta entre a quantidade de placa presente e a gravidade da doença. No entanto, esta correlação tende a ser mais fraca em estudos longitudinais (Carvalho et al., 2023).

2.2.2. Hipótese da placa específica

A hipótese da placa específica propõe que determinadas bactérias encontradas na placa dentária são responsáveis pelo desencadeamento de doenças orais como a cárie e a periodontite. Isto pode ajudar a elucidar a razão pela qual muitos doentes apresentam uma acumulação substancial de placa bacteriana, mas apenas uma minoria sofre de periodontite (Lavigne, 2023; Nyvad & Takahashi, 2020).

Esta hipótese surgiu durante a década de 1970 com o advento de técnicas baseadas em cultura e microscopia, permitindo a identificação de espécies bacterianas distintas na placa dentária. As observações revelaram que antibióticos específicos, mostravam uma eficácia notável contra espécies cariogénicas, como os *estreptococos* orais (Lavigne, 2023).

2.2.3. Hipótese da placa ecológica

A hipótese da placa ecológica elucida a progressão das doenças orais, postulando que o desequilíbrio microbiano, induzido pelo stress ecológico, é um fator chave. Esta hipótese sublinha a importância de toda a comunidade microbiana e do seu equilíbrio, em vez de visar apenas bactérias patogénicas específicas e propõe que as alterações ambientais, tais como alterações no pH, na disponibilidade de nutrientes ou na resposta do hospedeiro, podem despoletar a disbiose - uma perturbação na comunidade microbiana oral. Este desequilíbrio pode favorecer a proliferação de determinadas espécies bacterianas, promovendo assim o aparecimento de doenças orais (Marsh, 2006; Rosier et al., 2018).

Um aspeto essencial da hipótese da placa ecológica sugere que a prevenção da doença não consiste apenas em atacar diretamente os presumíveis agentes patogénicos, por exemplo, através de métodos antimicrobianos ou anti-adesivos. Implica também perturbar as pressões de seleção que conduzem à sua proliferação (Marsh, 2006; Rosier et al., 2018).

Vários membros bacterianos, ou combinações dos mesmos, dentro da comunidade desempenham papéis específicos que, coletivamente, estabelecem e mantêm uma microbiota conducente à doença, desencadeando a inflamação crónica (Belibasakis et al., 2023).

2.2.4. Hipótese do patogénio-chave

A hipótese do patogénio-chave postula que certos agentes patogénicos microbianos, mesmo em número mínimo, podem induzir alterações destrutivas significativas, deslocando uma microbiota simbiótico normal para um estado disbiótico. Os agentes patogénicos chave, embora presentes em baixa abundância, desencadeiam uma inflamação desproporcionada em relação ao seu número, contrariamente à crença de que a microbiota dominante instiga a inflamação. Estes agentes patogénicos desempenham um papel crucial na estabilização e manutenção da microbiota associado à doença (Hajishengallis et al., 2012, Kinane et al., 2017).

A hipótese alternativa que propõe que os agentes patogénicos periodontais conduzem à transição da microbiota simbiótica para um estado disbiótico, perturbando o equilíbrio homeostático habitual com o hospedeiro, encontra apoio na investigação que indica que a *P. gingivalis* emprega mecanismos intrincados para evadir ou manipular elementos do sistema imunitário do hospedeiro. Em vez de funcionar apenas como uma bactéria pró-inflamatória, a *P. gingivalis* desenvolveu estratégias sofisticadas para subverter ou escapar às respostas imunitárias do hospedeiro (Anithra Pereira et al., 2017).

Com base na evidência de que a *P. gingivalis* emprega mecanismos complexos para evitar e manipular as respostas imunitárias do hospedeiro, foi colocada a hipótese de que esta bactéria prejudica a imunidade inata de forma a alterar o crescimento e o desenvolvimento de todo o biofilme. Esta alteração disbiótica na composição do biofilme desencadeia então uma mudança destrutiva na interação hospedeiro-microrganismos normalmente homeostática no periodonto. Essencialmente, a *P. gingivalis*, uma bactéria gram-negativo há muito associada à etiologia da periodontite, pode funcionar como um agente patogénico fundamental da doença, provocando uma transformação disbiótica da microbiota periodontal. É importante salientar que a *P. gingivalis* reside nas bolsas periodontais, uma localização estratégica que lhe permite influenciar a composição e o comportamento da comunidade microbiana circundante (Hajishengallis et al., 2012; Sochalska & Petompa, 2017).

Mesmo em níveis mínimos de colonização, a *P. gingivalis* pode despoletar a periodontite, levando a alterações notáveis tanto na quantidade como na disposição das bactérias comensais orais no ecossistema. A *P. gingivalis* tem um papel fundamental como agente patogénico na perturbação do delicado equilíbrio do microbioma oral, contribuindo para o desenvolvimento e progressão da doença periodontal (Walkenhorst et al., 2020; Mulhall et al., 2020).

A bactéria *P. gingivalis*, demonstra um conjunto sofisticado de mecanismos para escapar às defesas do hospedeiro e estabelecer um ambiente propício à sua sobrevivência e proliferação. Em particular, as protéases de cisteína Arg-específicas de *P. gingivalis* exibem uma capacidade única semelhante ao complemento C5 convertase, gerando elevados níveis localizados de C5a para ativar o recetor C5a (C5aR) nos leucócitos. Esta ativação desencadeia uma interação complexa com o recetor Toll-like, simultaneamente

ativado por ligando de superfície de *P. gingivalis*, resultando numa inflamação acrescida e numa capacidade comprometida de diminuição leucócitos (Figura 3) (Hajishengallis et al., 2012; Yuan et al., 2021).

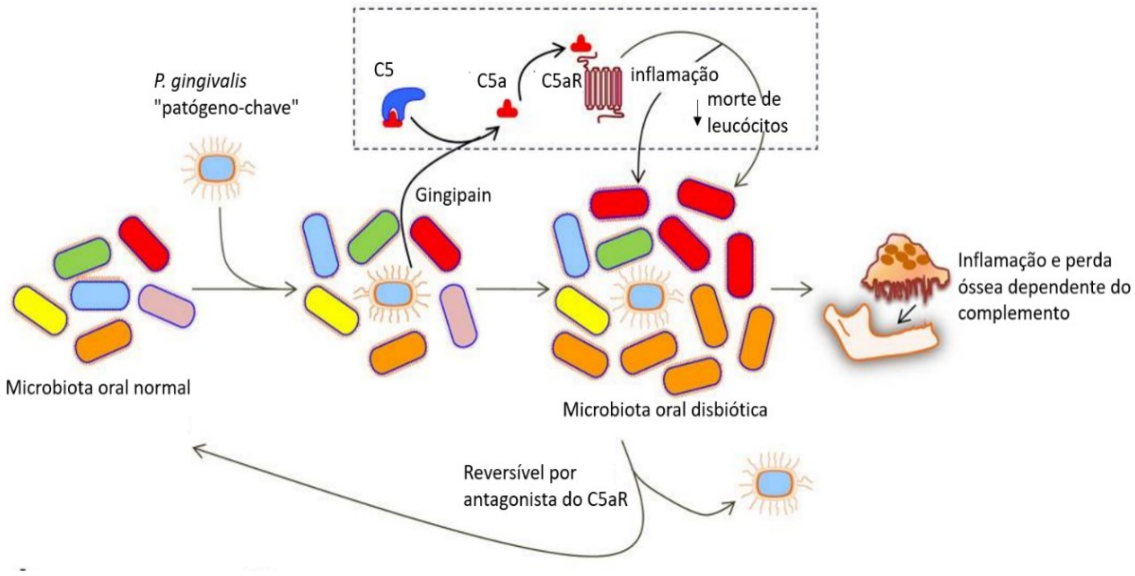

Figura 3 - Doença disbiótica induzida por patogénio-chave (Adaptado de Hajishengallis et al., 2012).

Além disso, a *P. gingivalis* anula estrategicamente as vias antimicrobianas dependentes do TLR4 nos leucócitos, expressando uma variante não convencional de LPS que antagoniza potentemente o TLR4. Adicionalmente, através da inibição da síntese de interleucina 8 (IL-8) pelas células epiteliais, facilitada por uma serina fosfatase secretada, a *P. gingivalis* atrasa o recrutamento de neutrófilos, ajudando a sua colonização inicial do periodonto (Hajishengallis et al., 2012; Yuan et al., 2021).

A síntese de IL-8 pelo epitélio gengival juncional, crucial para a criação de um gradiente de recrutamento de neutrófilos para a bolsa periodontal, é considerada uma marca da saúde periodontal, realçando ainda mais as estratégias intrincadas utilizadas por *P. gingivalis* para subverter as respostas imunitárias do hospedeiro e promover a progressão da doença periodontal (Hajishengallis et al., 2012; Sochalska & Petompa, 2017).

2.2.5. Modelo IMPEDE

O modelo de emergência polimicrobiana mediada por inflamação e exacerbação disbiótica (IMPEDE) fornece uma estrutura abrangente para a compreensão do papel central da inflamação como catalisador primário no desenvolvimento e progressão da periodontite associada à placa bacteriana. Este modelo elucida a forma como a interação entre a inflamação e o microbioma oral leva ao aparecimento de comunidades polimicrobianas e exacerba a disbiose no ambiente periodontal. Ao realçar a intrincada relação entre os processos inflamatórios e a dinâmica microbiana, este modelo sublinha a importância da inflamação como um fator central na formação das alterações patogénicas na microbiota oral que contribuem para o aparecimento e a gravidade da doença periodontal (Haritha & Yashaswini, 2022; Van Dyke et al., 2020).

A investigação recente centrada no microbioma oral tem-se debruçado sobre os factores que levam os micróbios comensais a passar de um estado simbiótico para um estado disbiótico. A hipótese IMPEDE postula um processo sequencial em que a resposta imunitária inata do hospedeiro desempenha um papel crucial na preservação da saúde oral ou no início da restauração da simbiose durante as fases iniciais da gengivite através da geração de inflamação inicial. Se estes esforços iniciais da resposta imunitária do hospedeiro se revelarem ineficazes para restabelecer ou preservar um equilíbrio simbiótico no microbioma oral, os micróbios patogénicos aproveitam a oportunidade para perturbar este equilíbrio, instigando a disbiose e abrindo caminho para o desenvolvimento da periodontite (Figura 4) (Van Dyke et al., 2020).

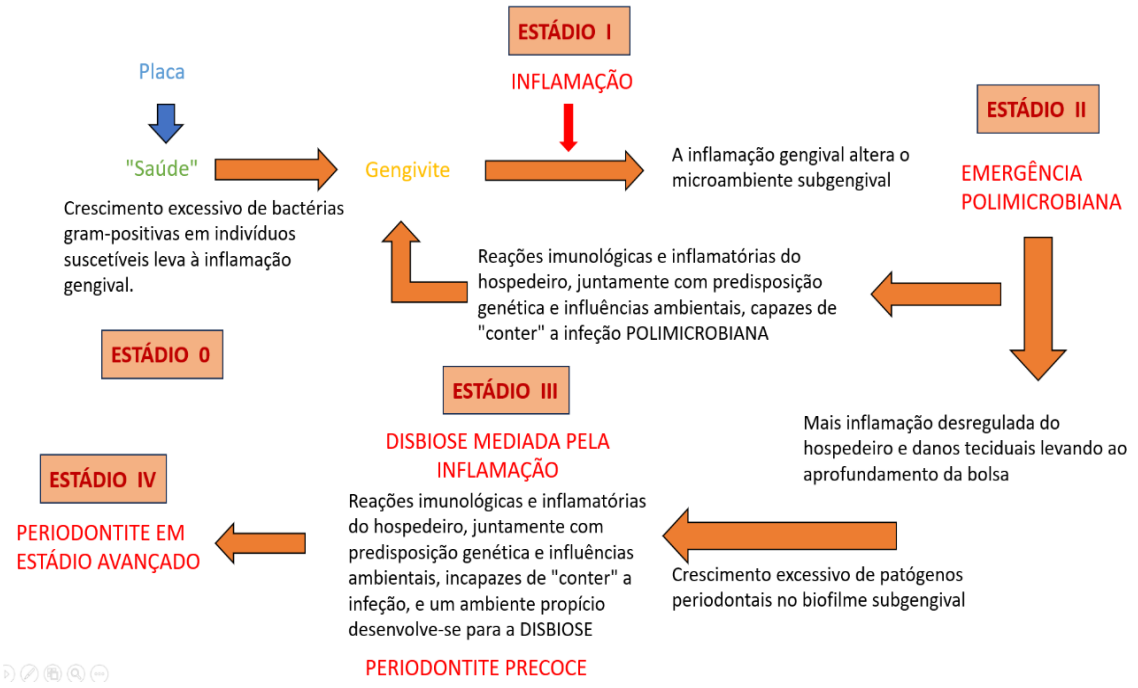

Figura 4- Modelo IMPEDE**:** Uma proposta para ilustrar como a inflamação atua como o principal impulsionador da periodontite associada à placa (Adaptado de Van Dyke et al., 2020).

Este modelo criado destina-se a complementar a atual classificação das doenças periodontais. Neste quadro de classificação, a periodontite é vista ao longo de um espetro que vai da saúde à doença, englobando quatro fases distintas que consideram factores como a gravidade, a complexidade, a extensão e a distribuição (Van Dyke et al., 2020; Abdulkareem et al., 2023).

O modelo IMPEDE fornece uma estrutura abrangente para compreender a progressão das doenças periodontais, com a inflamação a desempenhar um papel crucial em cada fase (Figura 5). O modelo reconhece cinco fases (0-4) que abrangem a saúde, a gengivite e a periodontite. As análises do microbioma e os estudos clínicos longitudinais identificaram quatro fases distintas de transições bacterianas da saúde para a fase final da periodontite, impulsionadas pela inflamação, formação de bolsas e composição bacteriana. A fase 0 representa estádio de saúde, seguida de quatro fases de desenvolvimento da doença: (1) gengivite, (2) início/periodontite precoce, (3) exacerbação da disbiose mediada pela inflamação através de um ciclo de alimentação auto-sustentado e (4) periodontite em fase tardia caracterizada por uma diminuição da diversidade polimicrobiana associada ao aparecimento de uma infeção polimicrobiana (Van Dyke et al., 2020).

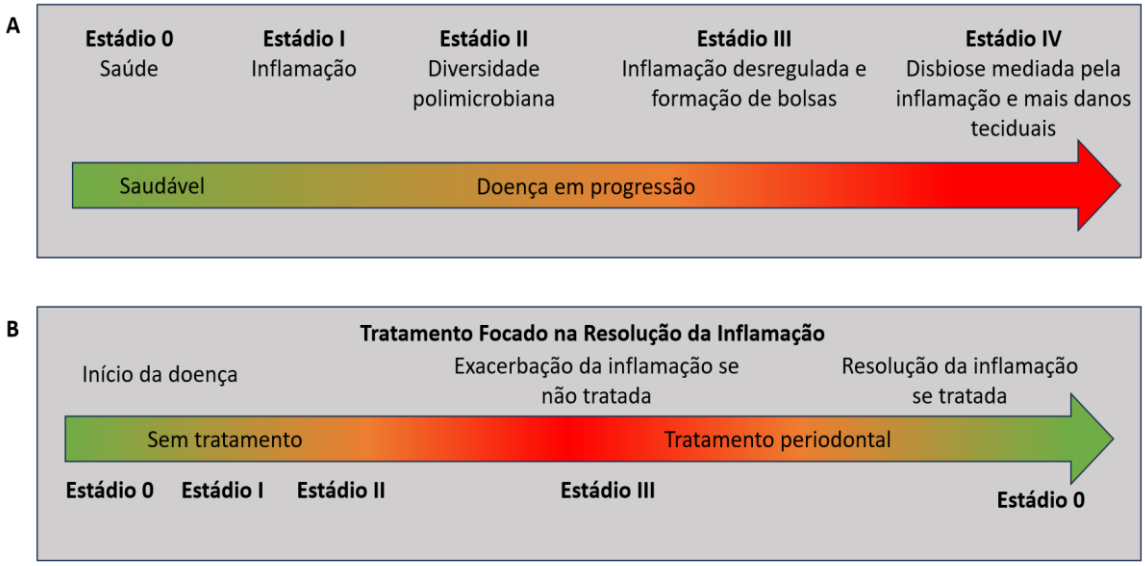

Figura 5- Estádios de Classificação da Doença Periodontal e Tratamento:
(A) Os estádios do modelo IMPEDE dentro do quadro de classificação
(B) A disbiose e os danos teciduais mediados pela inflamação podem piorar sem intervenção (Adaptado de Van Dyke et al., 2020).

No contexto das doenças periodontais, os possíveis agentes patogénicos incluem bactérias anaeróbias Gram-negativo, espiroquetas e até vírus. No entanto, é cada vez mais reconhecido que a patogénese destas doenças não é provavelmente atribuída a um único agente patogénico que atua isoladamente. Em vez disso, o conceito de disbiose surge como a principal "unidade" patogénica, tal como discutido anteriormente (Kiname et al., 2017).

A progressão da doença periodontal envolve um padrão cíclico caracterizado por fases alternadas de atividade e de quiescência, levando, em última análise, à destruição do dente e das estruturas circundantes se não for tratada. À medida que a doença avança da gengivite para a periodontite, há um aumento notável na colonização das bolsas periodontais mais profundas por organismos anaeróbios, incluindo patogénios como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. Estas bactérias desempenham um papel importante no desencadeamento da resposta inflamatória do hospedeiro. Esta resposta envolve a produção e libertação de biomarcadores inflamatórios, como a proteína c-reativa (PCR) e vários compostos de neutrófilos e macrófagos, incluindo o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), metaloproteinases da

matriz (MMPs), interleucina 1 (IL-1) e IL-8 (Kiname et al., 2017; Gasner & Schure, 2023).

A base para a compreensão da progressão temporal dos eventos da resposta do hospedeiro na periodontite foi estabelecida na década de 1970, quando Roy Page e Hubert Schroeder propuseram o primeiro modelo sistemático. Este modelo definiu quatro lesões histopatológicas distintas que exemplificam as fases sequenciais da gengivite e da periodontite. As lesões iniciais, precoce e estabelecida representam a progressão da gengivite, enquanto a lesão avançada é caracterizada pela perda óssea e se manifesta clinicamente como periodontite (Page et al., 1976).

A lesão periodontal inicial é caracterizada pela formação de uma placa bacteriana que resulta em alterações vasculares e na formação de espaços intercelulares, causando um aumento na quantidade de FCG. Este influxo de FCG é um indicador chave da lesão inicial, além disso, as moléculas de adesão desempenham um papel crucial ao atrair os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) para o local da lesão. Estes neutrófilos são essenciais para a resposta imunitária do organismo ao desafio bacteriano. Além disso, os linfócitos T têm como alvo específico os fibroblastos da área afetada, contribuindo para a progressão da lesão. Clinicamente, esta fase da lesão é considerada benigna, uma vez que ainda não apresenta sintomas significativos ou sinais visíveis de doença. A lesão periodontal precoce é marcada pelo desenvolvimento de vermelhidão no local, indicando uma progressão da lesão inicial. Esta fase é caracterizada por uma presença elevada de macrófagos e células T, que são componentes chave da resposta imunitária (Rosales & Uribe-Querol, 2017; Gasner & Schure, 2023; Page et al., 1976; Uriarte & Hajishengallis, 2022).

Os PMN infiltram-se na área, desempenhando um papel crucial na limpeza dos fibroblastos que estão a sofrer apoptose, ou morte celular programada. Esta infiltração tem um duplo efeito: não só remove as células danificadas, como também provoca a rutura das fibras de colagénio, levando a um aumento do espaço para novas infiltrações. Na lesão periodontal estabelecida, há uma presença predominante de agregação de leucócitos e células B, que podem ser células plasmáticas ou linfócitos. Estas células imunitárias desempenham um papel importante no início da transformação do local, alterando tanto o epitélio juncional como o epitélio sulcular, levando à formação do

epitélio de bolsa. Clinicamente, esta transformação manifesta-se como hemorragia após uma sondagem suave dos tecidos gengivais, indicando o comprometimento da saúde das estruturas periodontais (Rosales & Uribe-Querol, 2017; Gasner & Schure, 2023; Page et al., 1976; Uriarte & Hajishengallis, 2022).

A lesão periodontal avançada é iniciada pela migração do biofilme para a bolsa, criando um ambiente ideal para as bactérias anaeróbias se desenvolverem e proliferarem. Esta colonização leva a uma cascata de processos destrutivos nos tecidos periodontais. Uma das características marcantes desta fase é a perda irreversível de inserção e osso, que pode ser observada tanto histológica como clinicamente. A perda de fibras gengivais e osso alveolar são indicadores proeminentes da lesão avançada, realçando os danos extensos que ocorreram. Esta fase da doença periodontal é fortemente influenciada por factores microbianos, com as bactérias específicas presentes a desempenharem um papel crucial na gravidade e progressão da lesão. A lesão avançada pode resultar em várias alterações, dependendo da resposta imunitária e do organismo do hospedeiro (Rosales & Uribe-Querol, 2017; Gasner & Schure, 2023; Page et al., 1976; Uriarte & Hajishengallis, 2022).

A resposta imunitária do hospedeiro desempenha um papel crucial para a manutenção da saúde periodontal ao interagir com o biofilme subgengival associado ao dente (Moutsopoulos & Konkel, 2017).

Uma interação hospedeiro-microorganismos equilibrada é fundamental para um periodonto saudável, onde um infiltrado rico em células T, células apresentadoras de antigénios e neutrófilos patrulham ativamente a área. Por outro lado, um periodonto não saudável é caracterizado por uma resposta imunitária excessiva, com um aumento do número de células B, plasmócitos e neutrófilos em comparação com um estado saudável. Na gengiva saudável, uma pequena população de células T γδ e células linfóides inatas contribuem para a imunidade protetora e para a homeostase dos tecidos (Dutzan et al., 2016; Hajishengallis et al., 2020).

No entanto, os indivíduos susceptíveis à periodontite apresentam uma resposta ineficaz e desregulada do hospedeiro, levando à destruição dos tecidos. Embora as bactérias desempenhem um papel no desenvolvimento da doença, é sobretudo a resposta inflamatória do hospedeiro que causa os danos (Balta et al., 2021).

Os factores que influenciam a suscetibilidade à periodontite incluem factores genéticos, epigenéticos, ambientais, o envelhecimento e doenças sistémicas como a diabetes (Shaddox et al., 2021).

Esta doença não se enquadra na definição tradicional de uma infeção clássica. A disbiose, caracterizada por um desequilíbrio na comunidade microbiana, desempenha um papel importante na patogénese da periodontite. A resposta inflamatória despoletada pela disbiose pode levar à destruição dos tecidos. Os produtos de degradação desta inflamação são libertados no FCG, fornecendo nutrientes que promovem seletivamente o crescimento de espécies bacterianas específicas, tais como patogénios proteolíticos e asacarolíticos (Rosier et al., 2018; Diaz et al., 2016).

O padrão de tratamento atual para a gengivite e a periodontite centra-se na remoção mecânica de biofilmes microbianos patogénicos através de destartarização e alisamento radicular. No entanto, esta abordagem é apenas parcialmente eficaz para a maioria dos doentes com periodontite, e alguns indivíduos não respondem favoravelmente a este tratamento. Como resultado, a periodontite continua a ser um encargo significativo para a saúde e para a economia. Dado que o dano tecidual na periodontite é mediado principalmente pela resposta inflamatória do hospedeiro, que também é explorada pela comunidade microbiana disbiótica para crescimento e persistência, pode-se argumentar que as abordagens de modulação da resposta do hospedeiro podem servir como tratamentos adjuvantes promissores à terapia periodontal convencional. Ao visar simultaneamente a resposta inflamatória do hospedeiro e o desequilíbrio microbiano, estas novas estratégias terapêuticas podem potencialmente aumentar a eficácia dos tratamentos e melhorar os resultados dos pacientes com periodontite (Hajishengallis et al., 2020).

2.3. Factores de risco

Foram estabelecidos vários factores de risco, alguns dos quais são modificáveis, ou seja, esses factores podem ser alterados ou controlados para reduzir o risco de doença. (Kiname et al., 2017).

2.3.1. Factores de risco modificáveis

2.3.1.1. Tabagismo

O consumo de cigarros é um fator de risco modificável significativo para a periodontite crónica. Esta associação foi demonstrada através de vários estudos que examinaram a relação, a progressão e a intervenção do tabagismo com a doença periodontal (Apatzidou, 2022).

Os fumadores tendem a ter um pior estado periodontal e a sofrer uma perda dentária mais grave em comparação com os não fumadores, mesmo depois de terem em conta outros factores contribuintes. Estudos prospetivos demonstraram que os fumadores têm taxas de progressão mais elevadas de periodontite crónica e perda de dentes. Os estudos de tratamento revelaram resultados inferiores da terapia periodontal não cirúrgica e cirúrgica nos fumadores em comparação com os não fumadores. Isto sugere que fumar pode ter um impacto negativo na eficácia das intervenções periodontais (Kiname et al., 2017; Schmidt et al., 2020).

Os sinais de inflamação gengival podem ser menos pronunciados nos fumadores do que nos não fumadores. Isto deve-se à vasoconstrição e ao aumento da queratinização do tecido gengival associado ao tabagismo, que pode mascarar os sinais visíveis de inflamação (Kiname et al., 2017).

O risco de desenvolver doença periodontal, medido pela perda de inserção clínica e pela perda de osso alveolar, aumenta com a quantidade de tabaco. Esta relação dose-dependente sublinha a importância da cessação do tabagismo na manutenção da saúde periodontal (Schmidt et al., 2020).

2.3.1.2. Diabetes Mellitus

A diabetes, um problema de saúde global prevalente, tem um impacto significativo no bem-estar dos indivíduos afetados por ela. O aumento dos casos de diabetes no mundo exige uma abordagem proactiva na gestão dos factores de risco tradicionais, o que inclui a abordagem da saúde oral e o tratamento da doença periodontal.

Reconhecida como a sexta complicação da diabetes, a doença periodontal desempenha um papel crucial no diagnóstico precoce e na gestão da diabetes. A sua influência estende-se para além da saúde oral, potencialmente exacerbando complicações como a retinopatia. Os resultados positivos do tratamento periodontal no controlo metabólico em doentes diabéticos sublinham a importância de compreender a intrincada relação entre estas condições (Graves et al., 2020).

A diabetes não controlada pode comprometer os mecanismos de defesa do organismo, aumentando a suscetibilidade a infeções e contribuindo para problemas periodontais graves. Embora a progressão da doença periodontal nos diabéticos possa variar, a inflamação grave, as bolsas profundas e a perda óssea são comuns nas pessoas com uma higiene oral inadequada (Poudel et al., 2018).

Além disso, o impacto da diabetes no periodonto é evidente desde tenra idade, afetando mesmo crianças e adolescentes com diabetes tipo 1 ou tipo 2. Este facto sublinha a necessidade crítica de cuidados abrangentes que abordem tanto a diabetes como a saúde periodontal para melhorar o bem-estar geral e a qualidade de vida dos indivíduos com diabetes (Graves et al., 2020; Poudel et al., 2018).

2.3.1.3. Doenças cardiovasculares

Foram sugeridos vários mecanismos como possíveis ligações entre a doença periodontal e as doenças cardiovasculares ateroscleróticas (ASCVD) a inflamação sistémica, o mimetismo molecular e a lesão vascular direta mediada por agentes patogénicos são os mais importantes. A inflamação desempenha um papel importante na génese e progressão da aterosclerose e da doença periodontal. A figura 6 ilustra um modelo proposto que mostra a relação entre a doença periodontal e a doença cardiovascular (DCV). A periodontite está ligada a um estado pró-inflamatório em todo o corpo. Ela desencadeia tanto as respostas imunológicas inata quanto adaptativa através do envolvimento de células e citocinas, levando ao stress oxidativo e promovendo a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Esses processos contribuem para a formação de placas de ateroma. Além disso, os anticorpos direcionados contra patogénios periodontais podem reagir de forma cruzada com componentes da parede arterial devido ao mimetismo molecular, resultando em danos e maior acumulação de

placas. Com o tempo, a inflamação contínua enfraquece a placa de ateroma, aumentando o risco de rutura e levando a síndromes coronárias agudas e eventos cerebrovasculares (Benedek, 2017; Carrizales-Sepulveda et al., 2018).

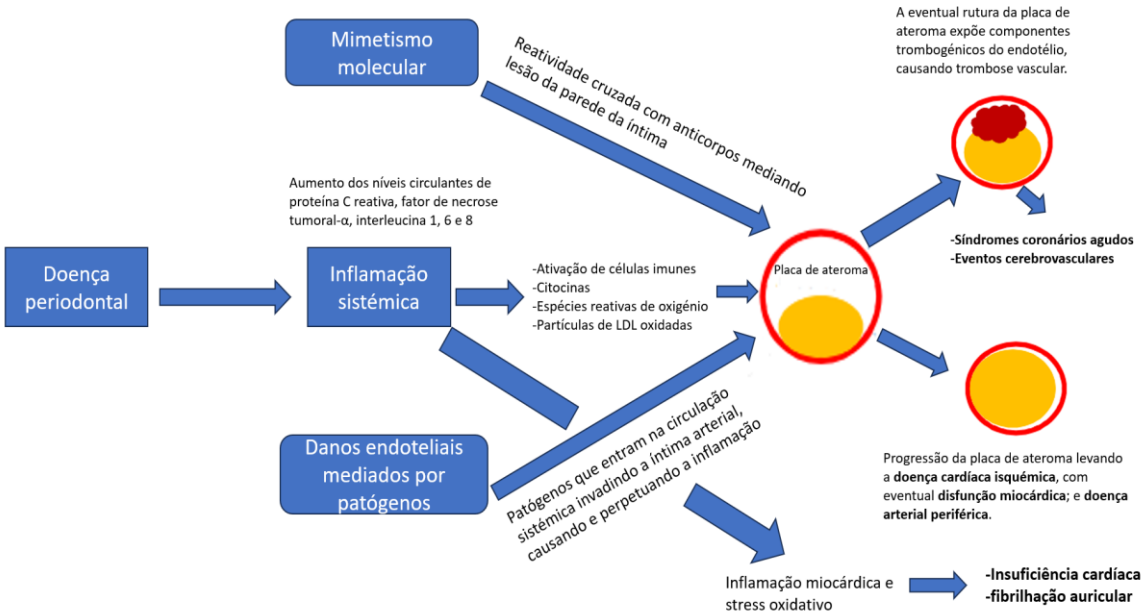

Figura 6- Modelo sugerido da relação entre doença periodontal e doença cardiovascular (Adaptado de Carrizales-Sepulveda et al., 2018).

Foi proposto que a doença periodontal também gera um estado inflamatório sistémico crónico. Estudos demonstraram que os doentes com doença periodontal apresentam níveis circulantes mais elevados de PCR (Michaud et al., 2017).

2.3.1.4. Perturbações induzidas por drogas (exemplo: cannabis)

Um dos efeitos secundários significativos associados ao consumo de canábis é a xerostomia, ou boca seca (Bellocchio et al., 2021).

É mais provável que o impacto negativo da cannabis nos tecidos periodontais esteja relacionado com os produtos de combustão resultantes da queima destas substâncias do que com os ingredientes ativos primários da própria cannabis (Quaranta et al., 2022).

Apesar das variações nas definições dos casos de exposição à cannabis e de doença periodontal, bem como dos parâmetros clínicos analisados, os dados de estudos

epidemiológicos realizados em diversas populações indicam que o consumo de cannabis a médio e longo prazo em indivíduos adultos pode ser um fator de risco para a doença periodontal independentemente de outros factores como o consumo de tabaco. Esta conclusão é verdadeira, mesmo tendo em conta as diferenças na forma como a exposição à cannabis e a doença periodontal são definidas e avaliadas nos vários estudos (Quaranta et al., 2022).

2.3.1.5. Stress

A relação entre o stress e a inflamação é complexa e bidirecional, sendo o stress capaz de desencadear a inflamação e a inflamação, por sua vez, de exacerbar os níveis de stress. Estes processos envolvem intrincadas redes de comunicação que englobam interações genéticas, neurais, endócrinas e imunitárias. A investigação, tanto em animais como em seres humanos, destaca as diversas formas como o stress afeta o sistema imunitário. O stress induz a libertação de hormonas neuroendócrinas, como os glucocorticóides e as catecolaminas, que, quando ativadas, têm efeitos prejudiciais nas funções imunitárias, como a redução das populações de linfócitos, a diminuição da proliferação de linfócitos, como por exemplo, a diminuição da atividade das células assassinas naturais, a diminuição da produção de anticorpos e a reativação de infeções virais latentes (Figura 7) (Kim et al., 2022; Gunepin et al., 2018).

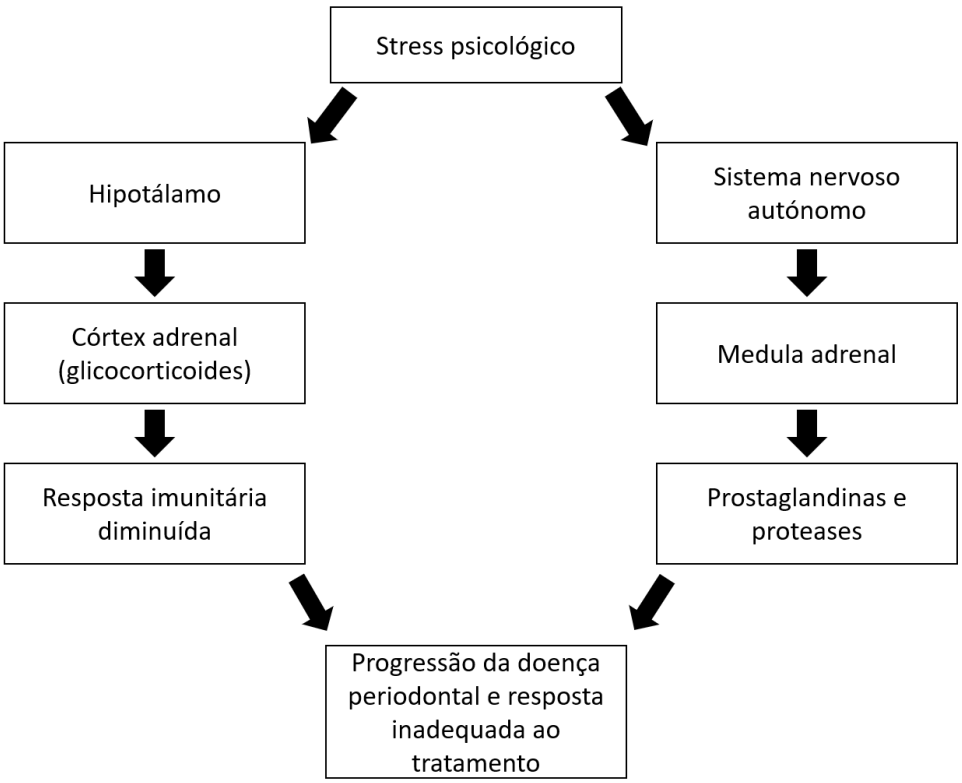

Figura 7- Mecanismos que conectam a adaptação inadequada ao stress com a progressão das doenças periodontais e/ou resultados subótimos de tratamento (Adaptado de Gunepin et al., 2018).

O stress crónico funciona através de vários mecanismos moleculares para induzir um estado de inflamação. No centro deste estado inflamatório está a libertação de citocinas pró-inflamatórias em resposta a sinais específicos. As citocinas, que são proteínas de sinalização, desempenham um papel crucial na transmissão de informações entre as células imunitárias e entre o sistema imunitário, o cérebro e o sistema endócrino. As principais citocinas envolvidas na geração de um estado de inflamação crónica induzida pelo stress incluem a interleucina-1beta, o TNF-α e a interleucina 6 (IL-6). Este processo é mediado pelo fator nuclear kappa B, ilustrando a intrincada interação entre o stress, a inflamação e a resposta imunitária (Sabbah et al., 2018; Gunepin et al., 2018).

2.3.1.6. Obesidade

A associação entre a doença periodontal e a obesidade está bem documentada na literatura mundial. Os mecanismos subjacentes envolvem uma complexa interação entre a disbiose no microbioma oral e as respostas inflamatórias sistémicas (Martinez-Herrera et al., 2017; Giordano-Kelhoffer et al., 2022).

Acredita-se que a inflamação relacionada com a obesidade desempenha um papel significativo na promoção da periodontite. Este processo envolve a secreção de marcadores inflamatórios pelo tecido adiposo, o que pode aumentar a inflamação gengival e facilitar a proliferação bacteriana na superfície da raiz do dente. Por outro lado, a própria periodontite pode desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias que podem contribuir para a obesidade e o desenvolvimento de outras doenças metabólicas crónicas. A intrincada interação entre a obesidade, a inflamação, a periodontite e a saúde sistémica sublinha a complexidade destas relações. (Iwashita et al., 2021; Pamuk & Kantarci, 2022).

2.3.2. Factores de risco não modificáveis

2.3.2.1. Osteoporose

A osteoporose, uma doença caracterizada pela perda de densidade óssea, pode ter um impacto significativo nos ossos maxilares. As alterações radiológicas associadas à osteoporose podem ser úteis no diagnóstico precoce desta condição. Para além disso, estas alterações nos ossos maxilares podem acelerar a degradação dos tecidos periodontais, principalmente no osso alveolar, levando à progressão das doenças periodontais (Yu & Wang, 2022).

Em contraste, várias doenças sistémicas comuns, incluindo a osteoporose, têm uma influência relativamente moderada na patogénese da periodontite. Embora estas condições sistémicas possam contribuir para a perda do aparelho periodontal, não conduzem a manifestações periodontais únicas ou graves. Em vez disso, devem ser consideradas como factores de risco para o desenvolvimento e progressão das doenças periodontais (Yu & Wang, 2022).

2.3.2.2. Alterações hormonais femininas

As flutuações hormonais ao longo da vida de uma mulher podem ter um impacto significativo na saúde oral, particularmente no desenvolvimento de gengivite. As alterações nos níveis hormonais podem levar a uma resposta inflamatória exagerada à placa dentária, resultando em gengivite. Esta condição é caracterizada pela deposição de

placa bacteriana e pela presença de gengiva altamente inflamada, marcada por sangramento e vermelhidão. As flutuações hormonais também influenciam a vascularização dos tecidos gengivais e periodontais através de recetores presentes nestes tecidos, levando à produção de prostaglandinas e ao movimento de leucócitos polimorfonucleares. Isto contribui ainda mais para o aumento da inflamação. Além disso, o estrogénio desempenha um papel no aumento da componente inflamatória da gengiva sem a deposição de placa bacteriana, o que também pode contribuir para o desenvolvimento de doenças periodontais (Boyapati et al., 2021).

2.4. Diagnóstico

Para diagnosticar com exatidão a periodontite, é necessária uma abordagem minuciosa, que inclua um exame clínico, técnicas de imagiologia e análise microbiana. A avaliação clínica é crucial na identificação de doenças periodontais, com indicadores importantes que incluem a profundidade de sondagem, a perda de inserção clínica, a hemorragia à sondagem e a inflamação gengival (Kinane et al., 2017).

O exame das gengivas é um aspeto vital do diagnóstico periodontal, oferecendo informações importantes sobre a saúde dos tecidos gengivais e ajudando na avaliação das condições periodontais. Durante esta avaliação, os médicos examinam vários factores para identificar a presença e a extensão das doenças das gengivas, como a gengivite ou a periodontite. Um elemento-chave do exame envolve a avaliação da cor, textura e contorno da gengiva. As gengivas saudáveis são normalmente cor-de-rosa, firmes e apresentam uma textura pontilhada, enquanto as gengivas inflamadas podem parecer vermelhas, inchadas e apresentar alterações na textura (Mohd Noh, 2023).

O índice de placa bacteriana, que avalia o nível de biofilme dentário nos dentes, desempenha um papel fundamental na avaliação da saúde periodontal, uma vez que o controlo eficaz da placa bacteriana é a base dos cuidados periodontais. Quando a placa dentária não é corretamente controlada, pode resultar em inflamação e no desenvolvimento de doenças periodontais (Carvalho et al., 2023; Kinane et al., 2017).

Além disso, a investigação tem demonstrado que os indivíduos com maus hábitos de higiene oral, incluindo os consumidores de cannabis e os fumadores de cigarros,

apresentam frequentemente valores mais elevados de placa bacteriana, o que aumenta a sua vulnerabilidade às doenças periodontais. O envolvimento da furca é um fator crítico no diagnóstico da periodontite, uma vez que a progressão da doença aumenta a probabilidade de perda de ligação do tecido conjuntivo e de maior comprometimento da área da furca (Bellocchio et al., 2021; Courval et al., 2020).

A mobilidade dos dentes, um indicador essencial no diagnóstico periodontal, reflete a extensão da perda de inserção e o nível de suporte ósseo que rodeia os dentes (Nibali et al., 2016).

A sondagem é um elemento-chave no diagnóstico periodontal, oferecendo informações críticas sobre a condição dos tecidos periodontais. Este procedimento envolve a utilização de uma sonda periodontal, um instrumento fino e calibrado, para medir a profundidade das bolsas periodontais à volta dos dentes (Nazir et al., 2020).

Ao efetuar a sondagem, é aconselhável utilizar uma técnica suave para evitar resultados falsos positivos que podem ocorrer devido à aplicação de pressão excessiva. Esta abordagem cuidadosa garante medições mais exatas e minimiza o desconforto para o paciente. Além disso, a sondagem deve ser efetuada sistematicamente em vários locais à volta de cada dente para proporcionar uma avaliação completa da condição periodontal (Carvalho et al., 2023; Nazir et al., 2020).

Profundidades de sondagem mais profundas indicam a presença de bolsas periodontais, que são espaços entre a gengiva e o dente que se expandiram como resultado da perda de inserção e da inflamação. A investigação demonstrou que maiores profundidades de sondagem estão associadas a uma maior perda de inserção clínica e a um maior risco de desenvolvimento de periodontite grave (Figura 8) (Kinane et al., 2017).

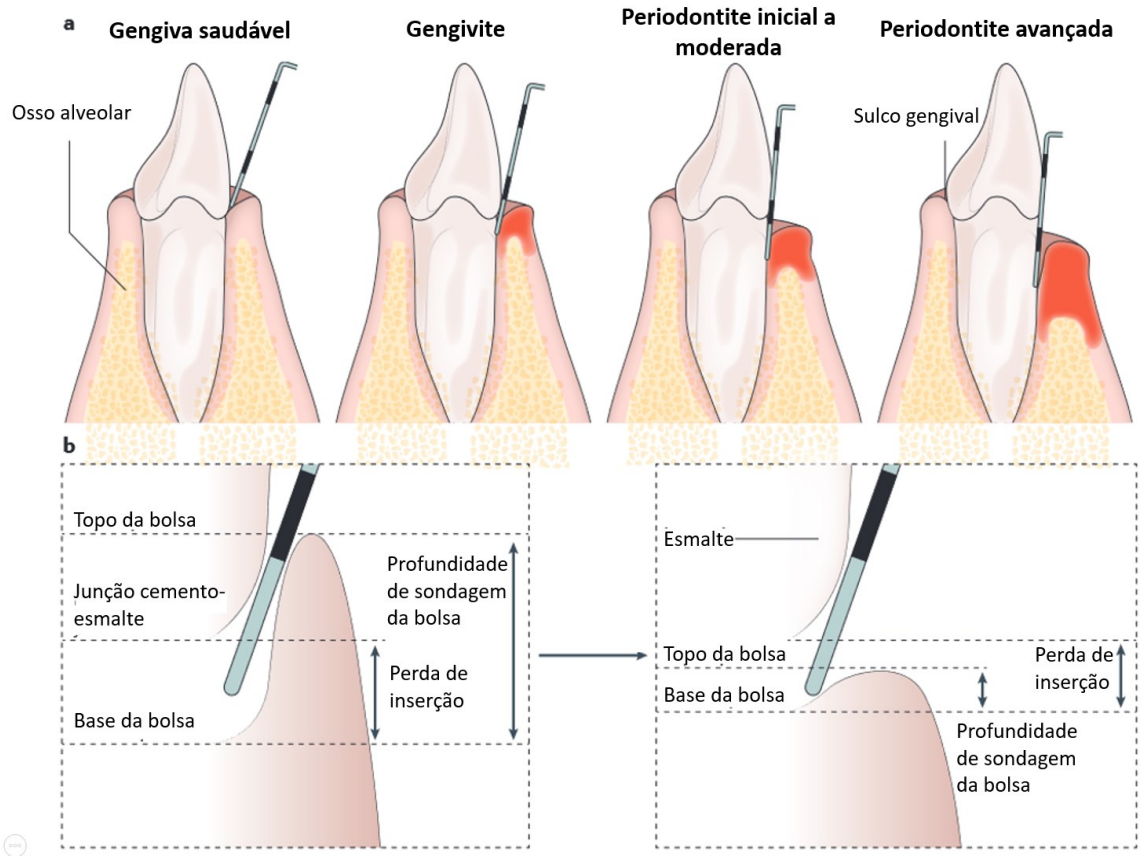

Figura 8- Os estádios principais da doença periodontal:
(a) Diagramas que ilustram gengivas saudáveis, gengivite, periodontite inicial a moderada e periodontite avançada
(b) Medição da profundidade da bolsa (Adaptado de Kinane et al., 2017).

As profundidades de sondagem superiores a 3 mm, as perdas de inserção clínica são indicadoras clínicos comummente utilizados para avaliar a saúde periodontal e monitorizar a progressão da doença. Além disso, índices como o índice de placa e a hemorragia à sondagem são ferramentas valiosas para avaliar a presença e a gravidade da periodontite (Carvalho et al., 2023; Shaddox et al., 2020).

Além disso, a sondagem é crucial para acompanhar a resposta a tratamentos periodontais como a destartarização e o alisamento radicular. Após a terapia, a sondagem permite aos clínicos avaliar a eficácia do tratamento, medindo as alterações nas profundidades de sondagem e nos níveis de fixação clínica. A investigação demonstrou que o alisamento radicular pode resultar numa redução das profundidades de sondagem e em melhorias nos marcadores clínicos, como a hemorragia à sondagem, indicando uma resposta favorável ao tratamento (Kang et al., 2021; Mulhall et al., 2020).

A hemorragia à sondagem é um indicador importante da inflamação e da saúde gengival, com os locais de hemorragia a assinalarem a doença periodontal ativa e a presença de gengivite. A monitorização da hemorragia à sondagem, juntamente com as profundidades de sondagem, oferece uma visão valiosa do estado inflamatório dos tecidos periodontais e ajuda a avaliar a eficácia da terapia periodontal (Kinane et al., 2017; Dutzan et al., 2016).

Além disso, as técnicas de imagiologia, como as radiografias, desempenham um papel vital na avaliação da perda óssea alveolar, uma caraterística fundamental da periodontite. A avaliação radiográfica permite a visualização da gravidade da perda óssea e é essencial tanto para o planeamento do tratamento como para a monitorização da progressão da doença (Nibali et al., 2016).

As radiografias oferecem uma visão detalhada do grau de perda óssea alveolar, uma caraterística fundamental desta doença inflamatória. Numerosos estudos utilizaram a análise radiográfica para avaliar a perda óssea em indivíduos com periodontite, demonstrando a eficácia das radiografias na determinação da gravidade da doença. Ao medir a distância entre a junção amelo-cementária e a crista óssea alveolar nos dentes posteriores, os clínicos podem avaliar com precisão a perda óssea e personalizar as estratégias de tratamento. Este facto sublinha a importância da avaliação radiográfica no diagnóstico abrangente das condições periodontais (Helmi et al., 2019).

2.5. Tratamento

2.5.1. Tratamento não cirúrgico

O tratamento da periodontite centra-se na paragem da progressão da doença, na redução do risco de perda de dentes, no alívio dos sintomas, na restauração dos tecidos periodontais danificados e na educação dos doentes para a manutenção de um periodonto saudável (Graziani et al., 2017).

As terapias não cirúrgicas desempenham um papel crucial na gestão da periodontite, oferecendo métodos eficazes para melhorar a saúde oral sem a necessidade de intervenção cirúrgica. Estas terapias têm como objetivo controlar a progressão da

doença periodontal através da instrumentação subgengival, que é normalmente dividida em três procedimentos principais: desbridamento, destartarização e alisamento radicular. O desbridamento envolve a remoção ou o rompimento da placa subgengival. A destartarização centra-se na eliminação de depósitos calcificados, enquanto o alisamento radicular visa a remoção do cemento radicular doente, remodelando a superfície da raiz. Especificamente, a destartarização envolve a limpeza de placa bacteriana, cálculo e manchas das superfícies da coroa e da raiz, enquanto o alisamento radicular remove o cemento ou a dentina superficial que contém cálculo, toxinas ou microrganismos (Mulhall et al., 2020; Kiname et al., 2017).

Uma vez estabelecidos os cuidados domiciliários adequados e o controlo do biofilme, deve proceder-se à destartarização e ao alisamento radicular em locais com profundidades de sondagem periodontal iguais ou superiores a 5 mm. Esta fase do tratamento deve também envolver a abordagem dos factores contributivos locais, a extração de dentes considerados irremediáveis e a gestão de lesões cariosas ativas. Para garantir o conforto do doente durante o procedimento de destartarização e alisamento radicular, recomenda-se a utilização de anestesia local adequada antes de iniciar o tratamento (Graziani et al., 2017).

O resultado clínico é fortemente influenciado pela experiência do operador, pelo empenho e motivação do doente para manter os cuidados adequados em casa e pela sua adesão ao programa de manutenção periodontal recomendado após a conclusão do tratamento ativo. Quando estes factores essenciais estão presentes, a terapêutica não cirúrgica pode ser tão eficaz como a intervenção cirúrgica, não se observando diferenças significativas nos resultados clínicos médios entre as duas abordagens (Kiname et al., 2017).

A redução efetiva da microbiota subgengival, crucial para promover um tecido periodontal saudável, pode ser conseguida com instrumentos manuais ou eléctricos. A destartarização e o alisamento radicular podem ser efetuados utilizando destartarizadores e curetas manuais, instrumentos ultra-sónicos ou uma combinação de ambos. Algumas curetas têm formas especializadas, incluindo variações de mini-lâminas, haste alargada, Langer e mini Langer. Os dois principais tipos de curetas, Universal e Gracey, diferem em termos de especificidade de área, ângulo e curvatura da aresta de corte e número de

arestas de corte. Os instrumentos manuais requerem uma afiação regular para manter a sua eficácia. Os estudos sugerem geralmente que a destartarização manual resulta numa superfície radicular mais lisa em comparação com a destartarização eléctrica (Ayub et al., 2022; Kinane et al., 2017).

Os instrumentos sónicos e ultra-sónicos, ambos tipos de ferramentas eléctricas, utilizam energia vibratória de alta frequência transferida para a ponta do raspador, produzindo vibrações entre 25.000 e 42.000 Hz, com amplitudes que variam entre 10 e 100 micrómetros. Estas vibrações ajudam na remoção do cálculo, enquanto um fornecimento de água ajuda a arrefecer a área e a evitar danos térmicos na gengiva durante o procedimento. Os scalers sónicos funcionam a frequências mais baixas, normalmente entre 3.000 e 8.000 ciclos por segundo, alimentados por uma unidade de turbina. Em contraste, os scalers ultra-sónicos utilizam um gerador que transforma a energia eléctrica em ondas ultra-sónicas através da tecnologia piezoeléctrica ou magnetostritiva, melhorando o processo de raspagem (Ayub et al., 2022; Kwon et al., 2021; Pulido et al., 2023).

Os instrumentos sónicos e ultra-sónicos são mais eficientes em termos de tempo do que os instrumentos manuais quando se realiza a instrumentação subgengival. À medida que a profundidade das bolsas ultrapassa os 4 mm, o acesso e a remoção completa da placa bacteriana e do cálculo com instrumentos manuais torna-se cada vez mais difícil devido ao desafio de alcançar as superfícies radiculares (Ayub et al., 2022).

Tanto a instrumentação manual como a ultra-sónica continuam a ser eficazes na remoção do cálculo subgengival e na alteração da microbiota subgengival. Além disso, ambas as abordagens conduzem a melhorias semelhantes nos principais parâmetros clínicos, incluindo reduções na profundidade de sondagem, ganhos nos níveis de fixação clínica e diminuição da hemorragia à sondagem (Kinane et al., 2017; Lee et al., 2020).

A destartarização e o alisamento radicular com instrumentos eléctricos requerem muito menos tempo e causam menos trauma nos tecidos moles, embora possam resultar em mais danos na superfície da raiz. Após a destartarização e o alisamento radicular inicial, é necessário um período de cicatrização de 4 a 6 semanas para permitir a recuperação do tecido conjuntivo antes da reavaliação. Durante a avaliação de

acompanhamento, são efetuadas novamente medições clínicas para determinar a resposta à terapia inicial. Se nenhum dente apresenta sinais de inflamação residual ou bolsas profundas, o paciente pode passar para a manutenção periodontal. No entanto, se a inflamação e a doença ativa persistirem, será necessário um novo tratamento - localizado ou generalizado, não cirúrgico ou cirúrgico - dependendo da extensão e gravidade da condição. É importante sublinhar que a adesão rigorosa às práticas recomendadas de cuidados domiciliários é essencial antes de considerar a terapia cirúrgica. A intervenção cirúrgica deve ser adiada até que o doente demonstre um controlo eficaz do biofilme para garantir resultados de tratamento ideais (Kiname et al., 2017; Graziani et al., 2017; Kwon et al., 2017).

Para melhorar os resultados do tratamento, foram introduzidos vários adjuvantes na terapia periodontal não cirúrgica, incluindo a administração local de medicamentos, antibióticos sistémicos e agentes sistémicos de modulação do hospedeiro. A administração local de medicamentos envolve a administração de antibióticos adjuvantes, como a minociclina e a doxiciclina, ou antimicrobianos como a clorexidina, diretamente na bolsa periodontal. Estes agentes são administrados através de sistemas especializados como pós, géis, chips ou fibras, proporcionando um tratamento direcionado e localizado para uma melhor eficácia terapêutica (Kinane et al., 2017).

A aplicação local de antibióticos é recomendada para pacientes com lesões localizadas ou locais que não respondem ou são recorrentes. Os antimicrobianos locais causam normalmente menos efeitos secundários, apresentam um menor risco de resistência bacteriana e promovem uma melhor adesão do doente em comparação com os antibióticos sistémicos. Embora os antibióticos locais tenham sido sugeridos como uma alternativa à terapêutica cirúrgica, a sua eficácia continua a ser debatida, o que levou à descontinuação de alguns produtos comerciais. Revisões sistemáticas e ensaios controlados aleatórios avaliaram os antimicrobianos locais para o tratamento da periodontite, mas os resultados variam significativamente com base em factores como o agente ativo utilizado, protocolos de estudo, populações-alvo, seleção de amostras e duração do estudo (Graziani et al., 2017).

A terapia antimicrobiana sistémica adjuvante é recomendada principalmente para pacientes com formas mais graves de periodontite, bem como para casos de periodontite associados a perfis microbiológicos específicos (Graziani et al., 2017).

Foram sugeridos vários regimes de antibióticos, que diferem no tipo, na dosagem, na duração e no momento de início. Normalmente, os antibióticos de largo espetro são utilizados isoladamente ou em combinação com outro antibiótico que visa especificamente as bactérias Gram-negativo, administrados em doses padrão para adultos durante 1 a 3 semanas. A combinação da amoxicilina e do metronidazol com a destartarização e o alisamento radicular demonstrou melhorias clínicas notáveis, particularmente na redução da profundidade de sondagem, na melhoria dos níveis de fixação clínica e na diminuição da hemorragia à sondagem, especialmente em bolsas mais profundas. Embora os resultados apoiem a eficácia desta combinação, os médicos devem ponderar cuidadosamente os benefícios em relação aos potenciais riscos, tais como a resistência aos antibióticos e as reações adversas. É aconselhável utilizar a dose eficaz mais elevada durante o período de tempo mais curto necessário. Para bolsas profundas localizadas, a utilização de antibióticos administrados localmente, como a minociclina, ou agentes antimicrobianos, como a clorexidina, também pode ser uma consideração apropriada (Kinane et al., 2017; Kwon et al., 2023).

Os probióticos são um tratamento bem estabelecido para determinadas infeções respiratórias e gastrointestinais, em que são introduzidas bactérias benéficas para competir com os agentes patogénicos por locais de ligação e nutrientes, ou para produzir substâncias que inibem as bactérias nocivas. Uma meta-análise de ensaios aleatórios demonstrou que o tratamento com probióticos na terapia periodontal resultou em ganhos de fixação clínica e numa redução das profundidades das bolsas de sondagem, particularmente em bolsas periodontais moderadas e profundas (Graziani et al., 2017).

Quando administrada em doses sub-antimicrobianas, a doxiciclina visa a resposta do hospedeiro em vez de atuar como um agente antimicrobiano. Nesta dosagem reduzida, a doxiciclina atua principalmente através da inibição das MMPs. Um estudo multicêntrico, aleatório e controlado demonstrou que a dose diária subantimicrobiana de doxiciclina, combinada com a destartarização e o alisamento radicular, proporcionou melhorias mensuráveis, mas modestas, no estado periodontal, embora a adesão tenha

surgido como um potencial desafio e os benefícios a longo prazo permaneçam incertos. A terapia de modulação do hospedeiro, como esta, pode ser especialmente benéfica para pacientes com uma maior suscetibilidade à doença periodontal (Kinane et al., 2017; Graziani et al., 2017).

É importante reconhecer que a literatura e os resultados que apoiam a maioria das modalidades terapêuticas adjuvantes são limitadas, com exceção dos antibióticos sistémicos. Os médicos devem ser cautelosos e basear-se nos resultados mais atualizadas ao considerarem a utilização destas terapêuticas adjuvantes no planeamento do tratamento (Kwon et al., 2023).

A terapia periodontal não cirúrgica, quer seja aplicada isoladamente ou em conjunto com tratamentos adjuvantes, é um método eficaz de gestão da periodontite crónica. Ajuda a reduzir a profundidade das bolsas e pode promover um certo grau de formação de novas ligações de ligamentos periodontais. No entanto, a terapia não cirúrgica tem limitações e pode ser necessária uma intervenção cirúrgica para controlar totalmente a inflamação e obter resultados óptimos. No entanto, a profundidade a que se consegue obter, de forma fiável, uma superfície livre de placa bacteriana e de cálculo é geralmente inferior a 4 mm. Em bolsas moderadas (4-6 mm) e profundas (>6 mm), a eficácia das curetas diminui e a obtenção de uma superfície livre de cálculo é mais provável quando é fornecido acesso cirúrgico para destartarização e alisamento radicular (Kinane et al., 2017; Kwon et al., 2021; Pulido et al., 2023).

2.5.2. Tratamento cirúrgico

O tratamento cirúrgico das bolsas que persistem após uma terapia bem-sucedida relacionada com a causa foi concebido para restaurar a anatomia periodontal e criar um ambiente oral que suporte a saúde periodontal a longo prazo. Existem várias abordagens cirúrgicas disponíveis para atingir estes objetivos, cada uma adaptada às necessidades específicas do paciente e à gravidade da condição (Graziani et al., 2017).

O desbridamento com retalho aberto é um procedimento cirúrgico no qual uma secção da gengiva é levantada para proporcionar uma melhor visibilidade e acesso à lesão subjacente (Figura 9). A investigação indica que a cirurgia com retalho de acesso é um

método eficaz para reduzir e, em alguns casos, eliminar completamente as bolsas periodontais residuais em defeitos intra-ósseos. Esta abordagem permite uma limpeza completa e uma melhor gestão das áreas afetadas, promovendo melhores resultados em termos de saúde periodontal (Kinane et al., 2017; Graziani et al., 2017).

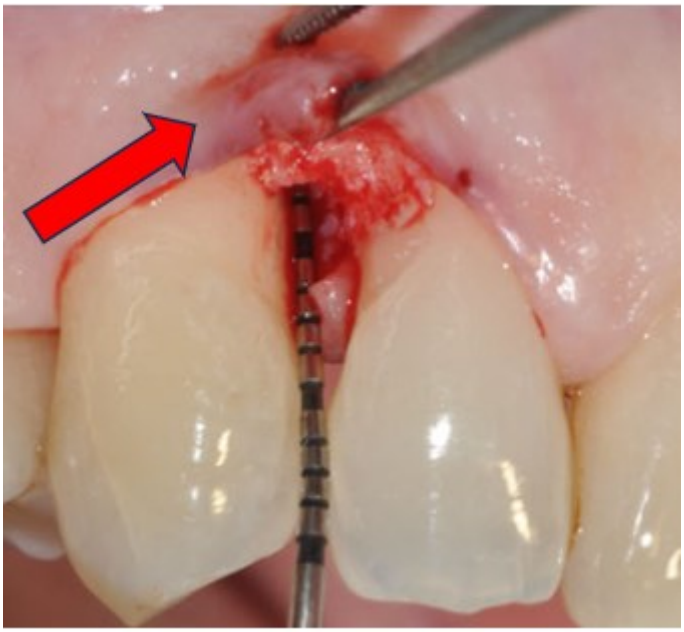

Figura 9- Elevação do retalho durante desbridamento com retalho aberto do defeito intraósseo (Adaptado de Graziani et al., 2017).

Em defeitos supra-ósseos com uma profundidade de sondagem inicial de 5 mm, o desbridamento com retalho aberto resulta normalmente numa redução da profundidade da bolsa de uma medida de 1,5 mm, deixando uma profundidade residual de 3,5 mm. Os defeitos inter-radiculares ou de furca apresentam um desafio particular na prática clínica devido à sua anatomia complexa e localização posterior na boca. Uma revisão de 11 ensaios clínicos aleatórios, com um mínimo de 6 meses de seguimento, envolvendo 199 pacientes e 251 defeitos de furca classe II, encontrou uma redução média da profundidade de sondagem de 1,38 mm aos 6 meses. Este resultado destaca a estabilização da inserção periodontal após a cirurgia de retalho de acesso, que é fundamental para a manutenção e sobrevivência a longo prazo de dentes multirradiculares (Graziani et al., 2017).

A cirurgia de redução de bolsas envolve a ressecção de tecidos moles e duros através de várias técnicas. Profundidades de sondagem persistentemente profundas estão frequentemente associadas a defeitos infra-ósseos ou verticais subjacentes, que reduzem significativamente a taxa de sobrevivência dos dentes afetados em comparação com os

dentes sem esses defeitos. Nestes casos, pode ser considerada a cirurgia de ressecção óssea. Este procedimento consiste na redução ou eliminação de defeitos ósseos infra-ósseos ou verticais através de osteotomia e osteoplastia. Após a remodelação do osso, o tecido gengival é reposicionado apicalmente para se alinhar com a nova altura da crista alveolar, resultando na resolução ou redução das profundidades de sondagem (Kwon et al., 2023; Kinane et al., 2017; Graziani et al., 2017).

A cirurgia regenerativa inclui técnicas como a regeneração guiada de tecidos, enxertos e a utilização de produtos biológicos. O principal objetivo da cirurgia periodontal regenerativa é restaurar os tecidos periodontais que foram perdidos devido a doença. Os objetivos específicos são melhorar a fixação dos dentes ao periodonto, incentivar a regeneração óssea e aumentar o suporte global da dentição. Para defeitos infra-ósseos ou verticais, a terapia regenerativa periodontal é também uma abordagem recomendada para promover a cicatrização e restaurar as estruturas perdidas (Kwon et al., 2023; Kinane et al., 2017; Graziani et al., 2017).

A regeneração tecidular guiada envolve a utilização de uma membrana de barreira juntamente com vários materiais de enxerto ósseo particulado para promover a regeneração dos tecidos periodontais (Figura 10). Ao longo do tempo, foram desenvolvidas várias abordagens e, mais recentemente, foram combinados modificadores biológicos com enxertos ósseos e membranas de barreira para melhorar ainda mais os resultados da regeneração. Um desses modificadores biológicos é o fator de crescimento BB derivado de plaquetas (PDGF-BB) humano recombinante purificado, um potente fator de crescimento que estimula a cicatrização de feridas, promovendo a proliferação e o recrutamento de células do ligamento periodontal e do osso. Do mesmo modo, os derivados da matriz de esmalte, por exemplo, a partir de células estaminais, têm sido utilizados na terapia regenerativa periodontal para estimular a proliferação de osteoblastos e células do ligamento periodontal, apoiando ainda mais a regeneração dos tecidos (Kwon et al., 2023; Graziani et al., 2017; Somyeong et al., 2023).

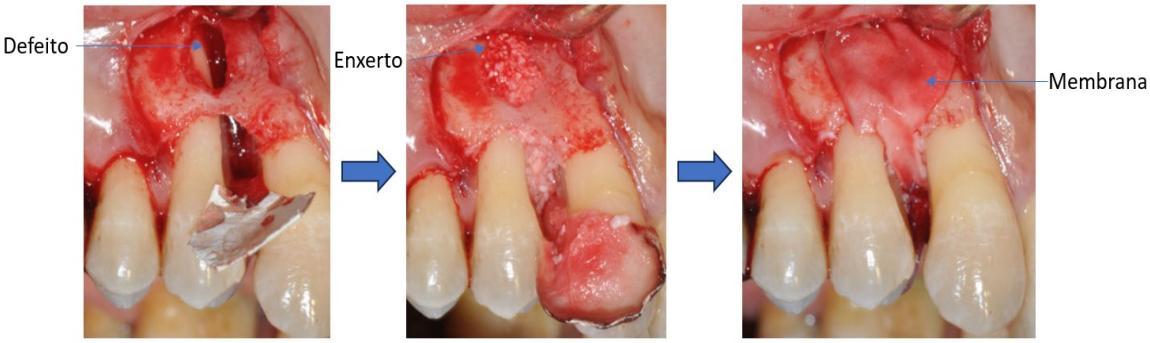

Figura 10- Aplicação de xenoenxerto e membrana de colagénio para regeneração tecidual guiada (Adaptado de Graziani et al., 2017).

O Procedimento de nova fixação assistido por laser (NFAL) surgiu como uma alternativa conservadora à terapia cirúrgica tradicional. O NFAL utiliza um laser Nd:YAG para a desepitelização inicial das bolsas periodontais e síntese de fibrina na coagulação final, eliminando a necessidade de bisturis e suturas. Esta técnica não requer uma elevação significativa do retalho gengival, o que a torna uma opção menos invasiva para o tratamento periodontal e potencialmente conduz a um menor desconforto pós-operatório e a tempos de cicatrização mais rápidos (Kinane et al., 2017; Kwon et al., 2023).

2.5.3. Tratamento periodontal de suporte

A terapia periodontal de suporte consiste em sessões de revisão regularmente programadas que se seguem à fase de tratamento ativo. Estas sessões são cruciais para monitorizar a saúde periodontal e gerir os factores de risco para evitar a recorrência e a progressão da periodontite. Foi demonstrado que a terapia periodontal controla significativamente a progressão da doença e reduz o risco de perda de dentes até dez vezes. No entanto, o sucesso a longo prazo da terapia periodontal depende em grande medida de uma manutenção adequada após a conclusão do tratamento ativo. A manutenção periodontal envolve a remoção por rotina da placa dentária supragengival e subgengival e é efetuada em intervalos regulares ao longo da vida do paciente para manter a saúde oral (Kinane et al., 2017; Graziani et al., 2017).

Geralmente, recomenda-se um intervalo de manutenção de 3 meses para os pacientes tratados para a periodontite crónica, uma vez que interrompe eficazmente o biofilme microbiano antes de este se tornar patogénico, apoiando a saúde periodontal a

longo prazo. No entanto, este intervalo deve ser adaptado a cada doente com base em factores individuais, como a história clínica, hábitos tabágicos, profundidades de sondagem residuais, outros factores de risco e a qualidade da sua rotina de cuidados em casa. Esta fase da terapia pode ser um desafio porque depende fortemente da motivação do paciente e da adesão ao calendário de revisões recomendado, exigindo um compromisso significativo de tempo e esforço para manter resultados bem-sucedidos (Kinane et al., 2017; Kwon et al., 2023).

Os pacientes que frequentam de forma consistente as consultas periodontais de apoio regulares apresentam geralmente alterações mínimas nos seus parâmetros clínicos. Por outro lado, os que faltam a estas consultas verificam frequentemente um regresso dos níveis de placa bacteriana às condições anteriores ao tratamento. O não cumprimento da terapêutica de manutenção pode afetar significativamente o prognóstico a longo prazo, uma vez que a taxa de progressão da periodontite crónica tratada sem manutenção regular é semelhante à da doença não tratada, realçando o papel crítico dos cuidados contínuos na gestão da saúde periodontal (Kinane et al., 2017; Graziani et al., 2017).

Uma sessão típica de terapia periodontal de suporte inclui uma avaliação abrangente da saúde oral do paciente, começando com atualizações dos seus históricos médicos e dentário. Segue-se uma avaliação dos seus esforços de controlo da placa bacteriana, avaliações radiográficas, se necessário, e exames extra-orais e intra-orais minuciosos dos tecidos moles. A sessão também inclui avaliações dentárias e periodontais. O aspeto da terapia de apoio centra-se em reforçar e motivar os bons hábitos de higiene oral, encorajar um estilo de vida saudável e efetuar uma remoção mecânica profissional da placa bacteriana. Isto envolve a limpeza das áreas supragengivais e o desbridamento subgengival de quaisquer bolsas residuais para manter a saúde periodontal (Graziani et al., 2017).

Nos casos de recorrência da doença, é crucial identificar as causas subjacentes e desenvolver um plano de tratamento adaptado. Embora a importância do controlo da placa bacteriana seja amplamente reconhecida, existe um debate permanente na literatura sobre o seu papel na prevenção da progressão da doença, particularmente em casos avançados. Alguns estudos sugerem que um controlo rigoroso da placa bacteriana é vital, enquanto outros argumentam que os cuidados profissionais de apoio podem oferecer maiores

benefícios do que variações nas práticas de higiene oral por si só. Isto realça a necessidade de uma abordagem equilibrada que combine o controlo da placa bacteriana orientado para o paciente com a manutenção profissional regular (Graziani et al., 2017).

III. CONCLUSÃO

As doenças periodontais, causadas principalmente por uma microbiota oral disbiótica, são influenciadas por uma combinação de factores genéticos, ambientais e de estilo de vida. A cavidade oral, que abriga uma comunidade microbiana diversificada, desempenha um papel crucial tanto na saúde oral como sistémica. Quando o equilíbrio deste ecossistema é perturbado, bactérias patogénicas como a *P. gingivalis* podem dominar, levando a inflamação crónica e destruição tecidual, características da periodontite.

Evidências de estudos de sequenciação microbiana demonstram que as alterações na composição da microbiota oral são centrais para o desenvolvimento da doença. Além disso, a interação entre a resposta imunológica do hospedeiro e as comunidades microbianas influência a gravidade da doença, sublinhando a importância de considerar tanto os factores microbianos como os do hospedeiro nas estratégias de tratamento.

A tese também explorou as implicações sistémicas da doença periodontal. O controlo da doença periodontal pode não apenas melhorar a saúde oral, mas também contribuir para um melhor controlo de condições sistémicas, reduzindo assim o risco de complicações.

Do ponto de vista clínico, tratamentos tradicionais como o alisamento radicular continuam a ser fundamentais no tratamento da doença periodontal. Tratamentos adjuntos, como antimicrobianos locais e sistémicos, bem como abordagens mais recentes como probióticos e terapias de modulação do hospedeiro, oferecem vias adicionais para melhorar os resultados dos pacientes, embora seja necessária mais investigação para compreender plenamente os seus benefícios a longo prazo.

Os avanços na sequenciação microbiana, particularmente na metagenómica, proporcionaram uma compreensão mais profunda da complexidade do microbioma oral. Estas ferramentas permitiram aos investigadores ir além da identificação de espécies microbianas, para compreender os seus papéis funcionais na saúde e na doença. Este é

um passo crítico para o desenvolvimento de marcadores de diagnóstico mais precisos e de terapias direcionadas que abordem as causas subjacentes da doença periodontal.

Ao integrar os avanços na investigação do microbioma com as práticas clínicas tradicionais, podemos desenvolver estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes. Isto poderá não apenas melhorar a saúde oral, mas também contribuir para o bem-estar geral dos indivíduos, reafirmando o papel crucial da saúde oral na saúde sistémica.

IV. BIBLIOGRAFIA

Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(11), 5721–5732. https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005

Abdulkareem, A. A., Al-Taweel, F. B., Al-Sharqi, A. J. B., Gul, S. S., Sha, A., & Chapple, I. L. C. (2023). Current concepts in the pathogenesis of periodontitis: From symbiosis to dysbiosis. *Journal of Oral Microbiology*, *15*(1). https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2197779

Abranches, J., Zeng, L., Kajfasz, J., Palmer, S., Chakraborty, B., Wen, Z., Richards, V., Brady, L., & Lemos, J. (2018). Biology of Oral Streptococci. *Microbiology Spectrum*, *6*(5). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018

Abusleme, L., Hoare, A., Hong, B.-Y., & Diaz, P. I. (2021). Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontology 2000*, *86*(1), 57–78. https://doi.org/10.1111/prd.12362

Albers, S.-V., Forterre, P., Prangishvili, D., & Schleper, C. (2013). The legacy of Carl Woese and Wolfram Zillig: From phylogeny to landmark discoveries. *Nature Reviews Microbiology*, *11*, 713–719. https://doi.org/10.1038/nrmicro3124

Amin, M., Tang, S., Shalamanova, L., Taylor, R. L., Wylie, S., Abdullah, B. M., & Whitehead, K. A. (2021). Polyamine biomarkers as indicators of human disease. *Biomarkers*, *26*(2), 77–94. https://doi.org/10.1080/1354750X.2021.1875506

Anithra Pereira, V. A., Jagadish Pai, B. S., & Pattanshetty, R. S. (2017). A REVIEW ON MODELS OF PATHOGENESIS IN PERIODONTITIS. *International Journal of Advanced Research*, *5*, 1115–1124. https://doi.org/10.21474/IJAR01/6065

Apatzidou, D. A. (2022). The role of cigarette smoking in periodontal disease and treatment outcomes of dental implant therapy. *Periodontology 2000*, *90*(1), 45–61. https://doi.org/10.1111/prd.12449

Arredondo, A., Àlvarez, G., Isabal, S., Teughels, W., Laleman, I., Contreras, M., Isbej, L., Huapaya, E., Mendoza, G., Mor, C., Nart, J., Blanc, V., & León, R. (2023). Comparative 16S rRNA gene sequencing study of subgingival microbiota of healthy subjects and patients with periodontitis from four different countries. *Journal of Clinical Periodontology*, *50*(9), 1176–1187. https://doi.org/10.1111/jcpe.13827

Ayub, U., Pisani, F., Qayyum, Z., Malik, S. A., & Khan, S. (2022). Non-Surgical Periodontal Therapy- A Beginning. *Journal of Women Medical and Dental College*, *1*(2). https://doi.org/10.56600/jwmdc.v1i2.37

Balta, M. G., Papathanasiou, E., Blix, I. J., & Van Dyke, T. E. (2021). Host Modulation and Treatment of Periodontal Disease. *Journal of Dental Research*, *100*(8), 798–809. https://doi.org/10.1177/0022034521995157

Bar-Even, A., Flamholz, A., Noor, E., & Milo, R. (2012). Rethinking glycolysis: On the biochemical logic of metabolic pathways. *Nature Chemical Biology*, *8*, 509–517. https://doi.org/10.1038/nchembio.971

Belibasakis, G. N., Belstrøm, D., Eick, S., Gursoy, U. K., Johansson, A., & Könönen, E. (2023). Periodontal microbiology and microbial etiology of periodontal diseases: Historical concepts and contemporary perspectives. *Periodontology 2000*. https://doi.org/10.1111/prd.12473

Bellocchio, L., Inchingolo, A., Inchingolo, A., Lorusso, F., Malcangi, G., Santacroce, L., Scarano, A., Bordea, I., Hazballa, D., D'Oria, M., Isacco, C., Nucci, L., Serpico, R., Tartaglia, G., Giovanniello, D., Contaldo, M., Farronato, M., Dipalma, G., & Inchingolo, F. (2021). Cannabinoids Drugs and Oral Health-From Recreational Side-Effects to Medicinal Purposes: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(15), 8329. https://doi.org/10.3390/ijms22158329

Benedek, T. (2017). Review. The Link between Periodontal Disease, Inflammation and Atherosclerosis—An Interdisciplinary Approach. *Journal of Interdisciplinary Medicine*, *2*(1), 11–16. https://doi.org/10.1515/jim-2017-0016

Bertolini, M., Costa, R. C., Barão, V. A. R., Villar, C. C., Retamal-Valdes, B., Feres, M., & Silva Souza, J. G. (2022). Oral Microorganisms and Biofilms: New Insights to Defeat the Main Etiologic Factor of Oral Diseases. *Microorganisms*, *10*(12), 2413. https://doi.org/10.3390/microorganisms10122413

Boyapati, R., Cherukuri, S. A., Bodduru, R., & Kiranmaye, A. (2021). Influence of Female Sex Hormones in Different Stages of Women on Periodontium. *Journal of Mid-Life Health*, *12*(4), 263–266. https://doi.org/10.4103/jmh.jmh_142_21

Bryan, N. S., & Petrosino, J. F. (2017). Nitrate-Reducing Oral Bacteria: Linking Oral and Systemic Health. In *Nitrite and Nitrate in Human Health and Disease*, 21–31. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46189-2_3

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

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869

Carrizales-Sepúlveda, E. F., Ordaz-Farías, A., Vera-Pineda, R., & Flores-Ramírez, R. (2018). Periodontal Disease, Systemic Inflammation and the Risk of Cardiovascular Disease. *Heart, Lung and Circulation*, *27*(11), 1327–1334. https://doi.org/10.1016/j.hlc.2018.05.102

Carvalho, A.-P., Moura, M.-F., Costa, F.-O., & Cota, L.-O.-M. (2023). Correlations between different plaque indexes and bleeding on probing: A concurrent validity study. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, *15*(1), 9–16. https://doi.org/10.4317/jced.60039

Cassat, J. E., & Skaar, E. P. (2013). Iron in Infection and Immunity. *Cell Host & Microbe*, *13*(5), 509–519. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.010

Courval, A., Harmouche, L., Mathieu, A., Petit, C., Huck, O., Séverac, F., & Davideau, J.-L. (2020). Impact of Molar Furcations on Photodynamic Therapy Outcomes: A 6-Month Split-Mouth Randomized Clinical Trial. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(11), 4162. https://doi.org/10.3390/ijerph17114162

Diao, J., Yuan, C., Tong, P., Ma, Z., Sun, X., & Zheng, S. (2021). Potential Roles of the Free Salivary Microbiome Dysbiosis in Periodontal Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 711282. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.711282

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.

Dutzan, N., Konkel, J. E., Greenwell-Wild, T., & Moutsopoulos, N. M. (2016). Characterization of the human immune cell network at the gingival barrier. *Mucosal Immunology*, *9*(5), 1163–1172. https://doi.org/10.1038/mi.2015.136

Edgar, R. C. (2018). Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics*, *34*(14), 2371–2375. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty113

Gánti, B., Molnár, E., Fazekas, R., Mikecs, B., Lohinai, Z., Mikó, S., & Vág, J. (2019). Evidence of spreading vasodilation in the human gingiva evoked by nitric oxide. *Journal of Periodontal Research*, *54*(5), 499–505. https://doi.org/10.1111/jre.12650

Gasner, N. S., & Schure, R. S. (2023). Periodontal Disease. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554590/

Giannopoulou, C., Krause, K.-H., & Müller, F. (2008). The NADPH oxidase NOX2 plays a role in periodontal pathologies. *Seminars in Immunopathology*, *30*(3), 273–278. https://doi.org/10.1007/s00281-008-0128-1

Giordano-Kelhoffer, B., Lorca, C., March Llanes, J., Rábano, A., del Ser, T., Serra, A., & Gallart-Palau, X. (2022). Oral Microbiota, Its Equilibrium and Implications in the Pathophysiology of Human Diseases: A Systematic Review. *Biomedicines*, *10*(8), 1803. https://doi.org/10.3390/biomedicines10081803

Graves, D. T., Ding, Z., & Yang, Y. (2020). The impact of diabetes on periodontal diseases. *Periodontology 2000*, *82*(1), 214–224. https://doi.org/10.1111/prd.12318

Graziani, F., Karapesta, 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

Graziani, F., Karapetsa, D., Mardas, N., Leow, N., & Donos, N. (2018). Surgical treatment of the residual periodontal pocket. *Periodontology 2000*, *76*(1), 150–163. https://doi.org/10.1111/prd.12156

Gu, W., Miller, S., & Chiu, C. Y. (2019). Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *14*, 319–338. https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751

Gui, M. j., Dashper, S. g., Slakeski, N., Chen, Y.-Y., & Reynolds, E. c. (2016). Spheres of influence: Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles. *Molecular Oral Microbiology*, *31*(5), 365–378. https://doi.org/10.1111/omi.12134

Gunepin, M., Derache, F., Trousselard, M., Salsou, B., & Risso, J.-J. (2018). Impact of chronic stress on periodontal health. *Journal of Oral Medicine and Oral Surgery*, *24*(1), 44-50. https://doi.org/10.1051/mbcb/2017028

Hajishengallis, G., Chavakis, T., & Lambris, J. D. (2020). Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontology 2000*, *84*(1), 14-34. https://doi.org/10.1111/prd.12331

Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The Keystone Pathogen Hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*, *10*, 717–725. https://doi.org/10.1038/nrmicro2873

Hajishengallis, G., & Korostoff, J. M. (2017). Revisiting the Page & Schroeder model: The good, the bad, and the unknowns in periodontal host response forty years later. *Periodontology 2000*, *75*(1), 116–151. https://doi.org/10.1111/prd.12181

Haritha, A., & Yashaswini, C. (2022). Models of periodontal disease pathogenesis: A journey through time. *Journal of Indian Society of Periodontology*, *26*(3), 204–212. https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_294_21

Hartenbach, F. A. R. R., Velasquez, É., Nogueira, F. C. S., Domont, G. B., Ferreira, E., & Colombo, A. P. V. (2020). Proteomic analysis of whole saliva in chronic periodontitis. *Journal of Proteomics*, *213*, 103602. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103602

Helmi, M. F., Huang, H., Goodson, J. M., Hasturk, H., Tavares, M., & Natto, Z. S. (2019). Prevalence of periodontitis and alveolar bone loss in a patient population at Harvard School of Dental Medicine. *BMC Oral Health*, *19*, 254. https://doi.org/10.1186/s12903-019-0925-z

Henry, L. G., Boutrin, M.-C., Aruni, W., Robles, A., Ximinies, A., & Fletcher, H. M. (2014). Life in a Diverse Oral Community – Strategies for Oxidative Stress Survival. *Journal of Oral Biosciences*, *56*(2), 63–71. https://doi.org/10.1016/j.job.2014.03.001

Hočevar, K., Vizovišek, M., Wong, A., Kozieł, J., Fonović, M., Potempa, B., Lamont, R. J., Potempa, J., & Turk, B. (2020). Proteolysis of Gingival Keratinocyte Cell Surface Proteins by Gingipains Secreted From Porphyromonas gingivalis – Proteomic Insights Into Mechanisms Behind Tissue Damage in the Diseased Gingiva. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 722. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00722

How, K. Y., Song, K. P., & Chan, K. G. (2016). Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 53. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00053

Iwashita, M., Hayashi, M., Nishimura, Y., & Yamashita, A. (2021). The Link Between Periodontal Inflammation and Obesity. *Current Oral Health Reports*, *8*, 76–83. https://doi.org/10.1007/s40496-021-00296-4

Jasma, P., & Sánchez, P. (2019). Porphyromonas gingivalis and its impact on periodontal health and systemic diseases. A concise review. *International Journal of Medical and Surgical Sciences*, *6*(1), 31–34. https://doi.org/10.32457/ijmss.2019.010

Jiang, Q., Chen, J., Yang, C., Yin, Y., & Yao, K. (2019). Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. *BioMed Research International*, *2019*(1), 2015978. https://doi.org/10.1155/2019/2015978

Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, *10*(1), 5029. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1

Kang, Y., Sun, B., Chen, Y., Lou, Y., Zheng, M., & Li, Z. (2021). Dental Plaque Microbial Resistomes of Periodontal Health and Disease and Their Changes after Scaling and Root Planing Therapy. *mSphere*, *6*(4), 1128. https://doi.org/10.1128/mSphere.00162-21

Kikuchi, Y., & Ishihara, K. (2021). Characterization of the Treponema denticola Virulence Factor Dentilisin. *Periodontal Pathogens: Methods and Protocols*, *2210*, 173-184. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0939-2_17

Kim, I.-B., Lee, J.-H., & Park, S.-C. (2022). The Relationship between Stress, Inflammation, and Depression. *Biomedicines*, *10*(8), 1929. https://doi.org/10.3390/biomedicines10081929

Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*(1), 17038. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38

Knight, R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolek, T., McCall, L.-I., McDonald, D., Melnik, A. V., Morton, J. T., Navas, J., Quinn, R. A., Sanders, J. G., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Tripathi, A., Xu, Z. Z., … Dorrestein, P. C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(7), 410–422. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0029-9

Kozak, M., & Pawlik, A. (2023). The Role of the Oral Microbiome in the Development of Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6), 5231. https://doi.org/10.3390/ijms24065231

Kwack, K. H., Jang, E.-Y., Yang, S. B., Lee, J.-H., & Moon, J.-H. (2022). Genomic and phenotypic comparison of *Prevotella intermedia* strains possessing different virulence *in vivo*. *Virulence*, *13*(1), 1133–1145. https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2095718

Kwon, T., Lamster, I. B., & Levin, L. (2021). Current Concepts in the Management of Periodontitis. *International Dental Journal*, *71*(6), 462-476. https://doi.org/10.1111/idj.12630

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

Lavigne, S. E. (2023). The evolution of plaque hypotheses: The past, present, and future. *Canadian Journal of Dental Hygiene*, *57*(2), 75-77.

Lee, Y.-H., Shin, S.-I., & Hong, J.-Y. (2023). Investigation of volatile sulfur compound level and halitosis in patients with gingivitis and periodontitis. *Scientific Reports*, *13*(1), 13175. https://doi.org/10.1038/s41598-023-40391-3

Lee, Y., Hong, Y., Kim, B., Lee, D., Kim, S., & Rhyu, I. (2020). Efficacy of salivary versus subgingival bacterial sampling for the detection and quantification of periodontal pathogens. *Journal of Periodontal & Implant Science*, *50*(6), 358–367. https://doi.org/10.5051/jpis.2002420121

Legge, A., & Hanly, J. G. (2018). Managing premature atherosclerosis in patients with chronic inflammatory diseases. *CMAJ*, *190*(14), 430–439. https://doi.org/10.1503/cmaj.170776

Li, X., Liu, Y., Yang, X., Li, C., & Song, Z. (2022). The Oral Microbiota: Community Composition, Influencing Factors, Pathogenesis, and Interventions. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 895537. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.895537

Liccardo, D., Cannavo, A., Spagnuolo, G., Ferrara, N., Cittadini, A., Rengo, C., & Rengo, G. (2019). Periodontal Disease: A Risk Factor for Diabetes and Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(6), 1414. https://doi.org/10.3390/ijms20061414

Liu, Y., Qiao, F., Wang, Z., Meng, G., Gu, Y., Wu, H., Liu, D., & Niu, K. (2024). Analysis of the microbial community diversity in various regions of the healthy oral cavity. *BMC Oral Health*, *24*(1), 978. https://doi.org/10.1186/s12903-024-04677-w

Lundmark, A., Hu, Y. O. O., Huss, M., Johannsen, G., Andersson, A. F., & Yucel-Lindberg, T. (2019). Identification of Salivary Microbiota and Its Association With Host Inflammatory Mediators in Periodontitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*, 216. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00216

Marsh, P. D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health*, *6*(1), 14. https://doi.org/10.1186/1472-6831-6-S1-S14

Martinez-Herrera, M., Silvestre-Rangil, J., & Silvestre, F.-J. (2017). Association between obesity and periodontal disease. A systematic review of epidemiological studies and controlled clinical trials. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, *22*(6), 708–715. https://doi.org/10.4317/medoral.21786

Michaud, D. S., Fu, Z., Shi, J., & Chung, M. (2017). Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk. *Epidemiologic Reviews*, *39*(1), 49-58. https://doi.org/10.1093/epirev/mxx006

Mira, A., Simon-Soro, A., & Curtis, M. A. (2017). Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *Journal of Clinical Periodontology*, *44*(18), 23–38. https://doi.org/10.1111/jcpe.12671

Mohd Noh, N. Z. (2023). A basic guide to gingival examination. *BDJ Student*, *30*(2), 30–31. https://doi.org/10.1038/s41406-023-0944-8

Moutsopoulos, N. M., & Konkel, J. E. (2018). Tissue specific immunity at the oral mucosal barrier. *Trends in Immunology*, *39*(4), 276-287. https://doi.org/10.1016/j.it.2017.08.005

Mulhall, H., Huck, O., & Amar, S. (2020). Porphyromonas gingivalis, a Long-Range Pathogen: Systemic Impact and Therapeutic Implications. *Microorganisms*, *8*(6), 869. https://doi.org/10.3390/microorganisms8060869

Nayfach, S., Roux, S., Seshadri, R., Udwary, D., Varghese, N., Schulz, F., Wu, D., Paez-Espino, D., Chen, I.-M., Huntemann, M., Palaniappan, K., Ladau, J., Mukherjee, S., Reddy, T. B. K., Nielsen, T., Kirton, E., Faria, J. P., Edirisinghe, J. N., Henry, C. S., … Eloe-Fadrosh, E. A. (2021). A genomic catalog of Earth's microbiomes. *Nature Biotechnology*, *39*, 499–509. https://doi.org/10.1038/s41587-020-0718-6

Nazir, M., Al-Ansari, A., Al-Khalifa, K., Alhareky, M., Gaffar, B., & Almas, K. (2020). Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *The Scientific World Journal*, *2020*. https://doi.org/10.1155/2020/2146160

Nibali, L., Sun, C., Akcalı, A., Meng, X., Tu, Y.-K., & Donos, N. (2017). A retrospective study on periodontal disease progression in private practice. *Journal of Clinical Periodontology*, *44*(3), 290–297. https://doi.org/10.1111/jcpe.12653

Nyvad, B., & Takahashi, N. (2020). Integrated hypothesis of dental caries and periodontal diseases. *Journal of Oral Microbiology*, *12*(1), 1710953. https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1710953

Olsen, I., & Singhrao, S. K. (2018). Importance of heterogeneity in *Porhyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A in tissue specific inflammatory signalling. *Journal of Oral Microbiology*, *10*(1), 1440128. https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1440128

Page, R. C., & Schroeder, H. E. (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *34*(3), 235–249.

Pamuk, F., & Kantarci, A. (2022). Inflammation as a link between periodontal disease and obesity. *Periodontology 2000*, *90*(1), 186–196. https://doi.org/10.1111/prd.12457

Poudel, P., Griffiths, R., Wong, V. W., Arora, A., Flack, J. R., Khoo, C. L., & George, A. (2018). Oral health knowledge, attitudes and care practices of people with diabetes: A systematic review. *BMC Public Health*, *18*(1), 577. https://doi.org/10.1186/s12889-018-5485-7

Prasad, S. V., Fiedoruk, K., Daniluk, T., Piktel, E., & Bucki, R. (2020). Expression and Function of Host Defense Peptides at Inflammation Sites. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(1), 104. https://doi.org/10.3390/ijms21010104

Preda, S. A., Comanescu, M. C., Albulescu, D. M., Dascălu, I. T., Camen, A., Cumpătă, C. N., Perlea, P., Bugălă, N. M., Stoica, E. L., Gheorghiță, L. M., Diaconu, O. A., & Tuculina, M. J. (2022). Correlations between periodontal indices and osteoporosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *23*(4), 254. https://doi.org/10.3892/etm.2022.11179

Pulido, P. G., Cantu, O. E., Franco, N. I. R., Pulido, J. I. R., González, G. I. M., Palma, G. C., & Sandoval, G. M. (2023). The use of oral probiotics in non-surgical periodontal therapy: Literature Review. *International Journal of Applied Dental Sciences*, *9*(1), 330–337. https://doi.org/10.22271/oral.2023.v9.i1e.1702

Quaranta, A., D'Isidoro, O., Piattelli, A., Hui, W. L., & Perrotti, V. (2022). Illegal drugs and periodontal conditions. *Periodontology 2000*, *90*(1), 62–87. https://doi.org/10.1111/prd.12450

Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, *35*(9), 833–844. https://doi.org/10.1038/nbt.3935

Rajasekaran, J. J., Krishnamurthy, H. K., Bosco, J., Jayaraman, V., Krishna, K., Wang, T., & Bei, K. (2024). Oral Microbiome: A Review of Its Impact on Oral and Systemic Health. *Microorganisms*, *12*(9), 1797. https://doi.org/10.3390/microorganisms12091797

Rosales, C., & Uribe-Querol, E. (2017). Neutrophil Role in Periodontal Disease. *Role of Neutrophils in Disease Pathogenesis*. https://doi.org/10.5772/67789

Rosier, B., Marsh, P., & Mira, A. (2018). Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *Journal of Dental Research*, *97*(4), 371–380. https://doi.org/10.1177/0022034517742139

Sabbah, W., Gomaa, N., & Gireesh, A. (2018). Stress, allostatic load, and periodontal diseases. *Periodontology 2000*, *78*(1), 154–161. https://doi.org/10.1111/prd.12238

Sälzer, S., Graetz, C., Dörfer, C. E., Slot, D. E., & Weijden, F. A. V. D. (2020). Contemporary practices for mechanical oral hygiene to prevent periodontal disease. *Periodontology 2000*, *84*(1), 35–44. https://doi.org/10.1111/prd.12332

Santacroce, L., Passarelli, P., Azzolino, D., Bottalico, L., Charitos, I., Cazzolla, A., Colella, M., Topi, S., Godoy, F., & D'Addona, A. (2023). Oral microbiota in human health and disease: A perspective. *Experimental Biology and Medicine, 248*(15), 1288-1301. https://doi.org/10.1177/15353702231187645

Schäffer, C., & Andrukhov, O. (2024). The intriguing strategies of Tannerella forsythia's host interaction. *Frontiers in Oral Health*, *5,* 1434217. https://doi.org/10.3389/froh.2024.1434217

Schmidt, J. C., Jajjo, E., Berglundh, T., & Zitzmann, N. U. (2020). Periodontitis lesions in smokers and non-smokers. *European Journal of Oral Sciences*, *128*(3), 196–203. https://doi.org/10.1111/eos.12693

Shaddox, L. M., Morford, L. A., & Nibali, L. (2021). Periodontal health and disease: The contribution of genetics. *Periodontology 2000*, *85*(1), 161–181. https://doi.org/10.1111/prd.12357

Simpson, B. W., & Trent, M. S. (2019). Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(7), 403–416. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0201-x

Sochalska, M., & Potempa, J. (2017). Manipulation of Neutrophils by Porphyromonas gingivalis in the Development of Periodontitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7,* 197. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00197

Somyeong, H., Hyun-Jin, L., Youngkyung, K., & Jun-Beom, P. (2023). Effects of Enamel Matrix Derivative on Cell Spheroids Made of Stem Cells Obtained from the Gingiva on Osteogenic Differentiation. *Medicina*, *59*(2), 377. https://doi.org/10.3390/medicina59020377

Sun, H., Zhou, Q., Qiao, P., Zhu, D., Xin, B., Wu, B., & Tang, C. (2022). Short-term head-down bed rest microgravity simulation alters salivary microbiome in young healthy men. *Frontiers in Microbiology*, *13,* 1056637. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1056637

Thompson, L. R., Sanders, J. G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K. J., Prill, R. J., Tripathi, A., Gibbons, S. M., Ackermann, G., Navas-Molina, J. A., Janssen, S., Kopylova, E., Vázquez-Baeza, Y., González, A., Morton, J. T., Mirarab, S., Zech Xu, Z., Jiang, L., … Knight, R. (2017). A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature*, *551*, 457–463. https://doi.org/10.1038/nature24621

Uriarte, S. M., & Hajishengallis, G. (2023). Neutrophils in the periodontium: Interactions with pathogens and roles in tissue homeostasis and inflammation. *Immunological Reviews*, *314*(1), 93–110. https://doi.org/10.1111/imr.13152

Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., & Reynolds, E. C. (2020). The Nexus Between Periodontal Inflammation and Dysbiosis. *Frontiers in Immunology, 11*, 511. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00511

Walkenhorst, M. S., Reyes, L., Perez, G., Progulske-Fox, A., Brown, M. B., & Phillips, P. L. (2020). A Uniquely Altered Oral Microbiome Composition Was Observed in Pregnant Rats With Porphyromonas gingivalis Induced Periodontal Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 92. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00092

Wang, Y., Huang, X., & He, F. (2019). Mechanism and role of nitric oxide signaling in periodontitis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *18*(5), 3929–3935. https://doi.org/10.3892/etm.2019.8044

Willis, J. R., & Gabaldón, T. (2020). The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. *Microorganisms*, *8*(2), 308. https://doi.org/10.3390/microorganisms8020308

Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(11), 5088–5090. https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088

Yongqing, T., Potempa, J., Pike, R. N., & Wijeyewickrema, L. C. (2011). The Lysine-Specific Gingipain of Porphyromonas gingivalis. *Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms*, *712*, 15-29. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8414-2_2

Yu, B., & Wang, C.-Y. (2022). Osteoporosis and periodontal diseases – An update on their association and mechanistic links. *Periodontology 2000*, *89*(1), 99–113. https://doi.org/10.1111/prd.12422

Yuan, S., Fang, C., Leng, W.-D., Wu, L., Li, B.-H., Wang, X.-H., Hu, H., & Zeng, X.-T. (2021). Oral microbiota in the oral-genitourinary axis: Identifying periodontitis as a potential risk of genitourinary cancers. *Military Medical Research*, *8*(1), 54. https://doi.org/10.1186/s40779-021-00344-1

Zhang, X., Li, L., Butcher, J., Stintzi, A., & Figeys, D. (2019). Advancing functional and translational microbiome research using meta-omics approaches. *Microbiome*, *7*(1), 154. https://doi.org/10.1186/s40168-019-0767-6

Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research*, *30*(6), 492-506. https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7

Zygiel, E. M., & Nolan, E. M. (2018). Transition Metal Sequestration by the Host-Defense Protein Calprotectin. *Annual Review of Biochemistry*, *87*, 621–643. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012312