



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

**MESTRADO INTEGRADO DE MEDICINA DENTÁRIA**

**PROBIÓTICOS E DOENÇA PERIODONTAL**

Trabalho submetido por

**Raquel Alexandra Ribeiro Raposo**

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**junho de 2016**



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

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**PROBIÓTICOS E DOENÇA PERIODONTAL**

Trabalho submetido por

**Raquel Alexandra Ribeiro Raposo**

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

**Professor Doutor Nuno Taveira**

**junho de 2016**



## Dedicatória

**Dedico este trabalho aos meus pais, a grande razão de ter chegado aqui!**

*“Não sei quantas almas tenho.*

*Cada momento mudei.*

*Continuamente me estranho*

*Nunca me vi nem acabei.*

*De tanto ser, só tenho alma.*

*Quem tem alma não tem calma”*

*Fernando Pessoa*



## **Agradecimentos**

Este trabalho não teria sido possível sem o apoio e contribuição de várias pessoas, a quem sinto devo prestar os meus agradecimentos.

Começo por agradecer ao Prof. Doutor Nuno Taveira, por ter aceite orientar este trabalho, por ter revelado interesse no tema proposto, pelas respostas atempadas, por toda a disponibilidade prestada, artigos facultados e por toda a sua exigência na perante a elaboração deste projeto.

Ao Prof. José Maria Neves Cardoso, por todo o tempo disponibilizado e apoio na execução deste trabalho, bem como pelos conhecimentos transmitidos e amabilidade que em muito enriqueceram este projeto.

À minha família, devo uma agradecimento muito especial, particularmente aos meus pais, por toda a paciência ao longo destes anos, pela educação e pelo apoio incondicional apesar de todas as dificuldades ao longo de todo o percurso académico, mostrando que todas as soluções estão em frente aos nossos olhos.

Um agradecimento especial também aos meus amigos de faculdade Vanessa, Adriana, Maria e Sara e Luís, Tiago e Guilherme pelo companheirismo, amizade, compreensão e ajuda nos momentos mais difíceis, principalmente neste último ano letivo (2015-2016).

Por último, gostaria de abranger os meus agradecimentos a todos os meus colegas e restantes amigos de faculdade, pelo conhecimento partilhado e por contribuírem direta ou indiretamente, para este trabalho.



## Resumo

A periodontite afeta cerca de 15 a 20% da população mundial entre os 35 e os 44 anos, sendo a principal responsável pela perda de dentes. A inadequada higiene oral promove o acumular de bactérias que não fazem parte da flora comensal na forma de placa. A gengivite é a primeira fase da doença, mas nem toda a gengivite dá origem a periodontite. A periodontite só ocorre quando há a presença de espécies bacterianas específicas na placa dentária. Estas bactérias estimulam respostas inflamatórias no hospedeiro que por sua vez desencadeiam a perda dos tecidos periodontais que suportam os dentes. Tanto a sua prevenção como o tratamento baseiam-se principalmente no adequado controlo de placa na cavidade oral. Além do controlo mecânico existem terapêuticas coadjuvantes que ajudam a evitar a recidiva da doença. Os probióticos são constituídos por bactérias comensais do organismo humano, e uma vez que têm a capacidade natural de inibir o crescimento de agentes patogénicos, podem vir a ser uma alternativa preventiva ou coadjuvante ao tratamento da doença periodontal.

Este trabalho teve como objetivo rever o estado atual do conhecimento sobre a doença periodontal e de que forma os probióticos poderão contribuir para a prevenção ou tratamento da doença periodontal. A elaboração deste trabalho envolveu uma pesquisa de artigos publicados nos últimos 5 anos através da Pubmed, B-on, Wiley Online Library e Google Académico. Foram utilizadas as seguintes palavras-chave: periodontite, tratamento, doença periodontal, microbioma oral e probióticos. A pesquisa deu origem a 152 referências bibliográficas arquivadas numa base de dados Mendeley. Foram recolhidos e lidos 75 artigos. Foram ainda consultados artigos de datas anteriores com a finalidade de contextualização histórica.

**Palavras-Chave:** doença periodontal, periodontite, fatores de risco, tratamento e probióticos.



## **Abstract**

Periodontitis affects approximately 15 to 20% of world's population between the ages of 35 to 44, being the main cause of tooth lost. The improper oral hygiene promotes the accumulation of bacteria that are not part of the commensal flora in the form of plaque. Gingivitis is the first stage of disease but not all gingivitis leads to periodontitis. Periodontitis only occurs when specific bacterial species are present in dental plaque. These bacteria stimulate the host inflammatory response which will trigger the loss of periodontal tissues that support the teeth. Both prevention and treatment are based mainly on the appropriate plaque control in the oral cavity. In addition to the mechanical control are therapeutic adjuncts to help prevent the recurrence of the disease. Probiotics are constituted by commensal bacteria of the human body, and since they have the natural ability to inhibit the growth of pathogens, can prove to be a preventive or adjunct alternative to treatment of periodontal disease.

This study aimed to review the current state of knowledge about periodontal disease and how probiotics can contribute to the prevention or treatment of periodontal disease. This work preparation involved a research of articles published in the last five years through Pubmed, B-on, Wiley Online Library and Google Scholar. The following keywords were used: periodontitis treatment, periodontal disease, oral microbiome and probiotics. The search yielded 152 references stored in a Mendeley database. 75 articles were collected and read. There were also consulted articles of earlier dates for the purpose of historical context.

**Keywords:** periodontal disease, periodontitis, risk factors, treatment and probiotics



# Índice

<b>I - Introdução .....</b>	<b>23</b>
<b>II – Desenvolvimento .....</b>	<b>25</b>
<b>1. Doença Periodontal .....</b>	<b>25</b>
1.1. História da classificação da doença periodontal.....	28
1.2. Diagnóstico da doença periodontal.....	31
1.3. Gengivite .....	36
1.4. Periodontite e lesões periodontais .....	39
1.5. Epidemiologia.....	45
1.6. A resposta inflamatória como mediadora da doença periodontal.....	47
1.7. Fatores de risco para a doença periodontal.....	55
1.7.1. Tabaco .....	56
1.7.2. Diabetes Mellitus.....	58
1.7.3. Depressão .....	61
1.7.4. Genética do hospedeiro .....	62
1.8. Tratamento e prevenção.....	65
<b>2. Probióticos .....</b>	<b>69</b>
2.1. Requisitos ideais.....	69
2.2. Mecanismos de ação .....	70

2.3. Potenciais riscos .....	72
<b>3. Probióticos na prevenção da doença periodontal: estado da arte.....</b>	<b>73</b>
<b>III- Conclusão .....</b>	<b>83</b>
<b>IV – Bibliografia .....</b>	<b>87</b>

## Índice de Figuras

- Figura 1 - Constituintes do periodonto: (1) gengiva; (2) ligamento periodontal; (3) osso alveolar próprio; (4) cimento; (5) osso alveolar. Retirada e adaptada de: livro “*Clinical Periodontology and Implant Dentistry*” 5ª Edição Lindhe, (2008)..... 25
- Figura 2 - Saúde periodontal e doença em função da comunidade oral periodontal e a resposta do hospedeiro. Retirada e adaptada de: artigo “*Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: Symbiosis and dysbiosis*” Roberts e Darveau, 2015..... 27
- Figura 3 – Caracterização clínica da gengiva. A – gengiva normal de jovem adulto; B – gengiva ligeiramente melanótica (pigmentada) de adulto. Retirada e adaptada de: livro “*Carranza’s Clinical Periodontology*” Newman et al., (2015) página 20. ... 31
- Figura 4 - Modelos de sondas periodontais. Retirada e adaptada de: página de internet “*Dental Quirúrgic’s*” ..... 33
- Figura 5 - Representação de sondagem com vários resultados de perda de inserção periodontal. Retirada e adaptada de: “*Oral Health Surveys*” (WHO, 2013) ..... 34
- Figura 6 – Sondagem periodontal efetuada com sonda graduada numa bolsa periodontal. 1 – gengivite; 2 – periodontite ligeira; 3 – periodontite moderada; 4 – periodontite severa. Retirada e adaptada de: <http://www.clinicadentalruiz.com/espa%C3%B1ol/tratamientos/periodoncia/> ..... 35
- Figura 7 – Fotografia de jovem adulto de 22 anos com gengivite. Gengiva aumentada de volume característico de inflamação e coloração mais avermelhada. .... 36
- Figura 8 - Formação da placa dentária e respetivas bactérias envolvidas desde a primeira adesão à película salivar aderida à superfície dentária, continuando com os colonizadores primários envolvidos e os colonizadores tardios. Retirada e adaptada de: livro “*Clinical Periodontology and Implant Dentistry*” 5ª Edição Lindhe, (2008) ..... 37

Figura 9 - Imagem da cavidade oral de paciente com o estado de doença Gengivite Ulcerativa Necrosante Aguda. Retirada e adaptada de: panfleto da empresa farmacêutica DEHON.....	38
Figura 10 - Fotografia de paciente com periodontite crônica (a) e radiografia ortopantomografia do mesmo paciente (b). Retirada e adaptada de: artigo “ <i>Diagnosis and classification of periodontal disease</i> ” (Highfield, 2009).....	39
Figura 11 - Representação de periodontite agressiva generalizada. (a) fotografia frontal intra-oral aos 16 anos; (b) ortopantomografia aos 16 anos; (c) ortopantomografia aos 21 anos. Retirada e adaptada de: artigo “ <i>Diagnosis and classification of periodontal disease</i> ” (Highfield, 2009) .....	40
Figura 12 - Complexos microbianos. 1 – complexo azul, 2 – complexo amarelo, 3- complexo roxo, 4- complexo verde, 5 – complexo laranja, 6 – complexo vermelho. Retirada e adaptada de: livro “ <i>Clinical Periodontology</i> ” (Lindhe, 2008). .....	42
Figura 13 - Fotografia de paciente com periodontite aguda ulcerativa necrosante. Retirada e adaptada de: artigo “ <i>Diagnosis and classification of periodontal disease</i> ” (Highfield, 2009) .....	43
Figura 14 – Abscesso periodontal. Retirada e adaptada de: “ <i>How do I Manage a Patient with Periodontal Abscess?</i> ” (Marquez, 2013) .....	44
Figura 15 – Lesão Endo-Perio (Esquerda) e Tratamento Endo-Perio (Direita). Retirada e adaptada: artigo “ <i>Endo-periodontal lesion-endodontic approach</i> ” (Jivoinovici et al., 2014).....	44
Figura 16 – Índice Comunitário Periodontal de jovens Portugueses de 12 e 15 anos. Retirada e adaptada de: “ <i>Estudo Nacional de Prevalência das Doenças Orais</i> ” (von Amann e Cádima, 2008).....	45
Figura 17 – Estado periodontal de indivíduos entre os 35 e os 44 anos por região mundial. Retirada e adaptada de: ” <i>WHO Global Oral Health Data Bank and WHO</i> ”	

- Oral Health Country/Area Profile Programme, 2000*” - Dr.Poul Erik Petersen, World Health Organization. .... 47
- Figura 18 – Sulco, espaço biológico periodontal e constituição do espaço biológico. Retirada e adaptada de: <http://image.slidesharecdn.com/manutenomimplantodontia-140916222236-phpapp01/95/manutenom-em-implantodontia-4-638.jpg?cb=1410906365> ..... 48
- Figura 19 - Imagem correspondente ao rácio RANKL/OPG. No caso 1-Homeostase as concentrações estão equilibradas, enquanto no caso 2-Doença a concentração de RANKL está aumentada em relação à OPG. Retirada e adaptada de: artigo “*Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis*” de Darveau (2010). .... 51
- Figura 20 - *Porphyromonas gingivalis*, membro do complexo vermelho bacteriano, inibe as funções de defesa inatas do hospedeiro no epitélio gengival. a) SerB, uma fosfoserina fostase, inibe a interleucina-8 (IL-8) e conseqüentemente pode perturbar outros processos homeostáticos celulares epiteliais. b) Estruturas específicas do lípido A nos lipopolisacaridos da *Porphyromonas gingivalis* inibe a respostas dos recetores 4 do tipo Toll para outras bactérias. Retirada e adaptada de: artigo “*Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis*” de Darveau (2010). .... 54
- Figura 21 - Relação bidirecional entre a Diabetes Mellitus tipo II e a periodontite. Legenda: IL - interleucina; TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral- $\alpha$ ; PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E2, AGE – produtos avançados de glicação; PMN – neutrófilos polimorfonucleares. Retirada e adaptada de: artigo “*Management of diabolical diabetes mellitus and periodontitis nexus: are we doing enough?*” (Gurav, 2016)59
- Figura 22 - Representação de polimorfismo de nucleótico único (SNP). Retirada e adaptada de: página de internet <http://grupogudic.blogspot.pt/2014/06/patrones-de-migracion-y-el-dna.html> ..... 63
- Figura 23 – (a) ilustração do efeito do tratamento com placebo e com *Lactobacillus brevis* CD2 em ratos. (b) representação da expressão relativa de mRNA das

citocinas pró-inflamatórias (TNF; IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17A), nos grupos placebo e tratados nos com *Lactobacillus brevis* CD2. Retirada e adaptada do artigo “*Topical treatment with probiotic Lactobacillus brevis CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss*” (Maekawa e Hajishengallis, 2014). ..... 75

Figura 24- Expressão relativa de Lts e CDTs às 3 e às 6 horas. \*, \*\* - diferença estatisticamente significante. Retirada e adaptada de: artigo “*Lactobacillus salivarius and L. gasseri down-regulate Aggregatibacter actinomycetemcomitans exotoxins expression*” (Nissen et al., 2014) ..... 77

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Classificação das doenças periodontais segundo a AAP, 1999.....	30
Tabela 2 - Comparação do número de bactérias na Periodontite Agressiva Generalizada e Periodontite Crônica Generalizada. Retirada e adaptada de: artigo “ <i>Clinical and microbiological evaluation of biofilme-gingival interface classification in patients with generalized forms of periodontitis</i> ” (Kowalski e Gerska, 2014).....	41
Tabela 3 – Constituintes salivares que contribuem para a imunidade inata. Retirada e adaptada de: “ <i>Carranza’s Clinical Periodontology</i> ” (Newman et al., 2015) .....	48
Tabela 4 - Bactérias tipicamente prevalentes na composição de cada estado periodontal. Retirada e adaptada de: artigo “ <i>Review Article Trends in Laboratory Diagnostic Methods</i> ” (Bolerázska, Mareková e Markovská, 2016).....	50
Tabela 5 – Fatores de Virulência da <i>Porphyromonas gingivalis</i> que atuam no Sistema Imune. Retirada e adaptada de: “ <i>Carranza’s Clinical Periodontology</i> ” (Newman et al., 2015).....	52
Tabela 6 - Proporções de linfócitos T das amostras de sangue em pacientes com periodontite agressiva generalizada, periodontite crônica e saúde periodontal. Retirada e adaptada de: artigo “ <i>The role of activated cytotoxic T cells in etiopathogenesis of periodontal disease: does it harm or does it heal?</i> ” (Cifcibasi et al., 2015).....	55



## **Abreviaturas**

**AAP** - academia americana de Periodontologia

**ACTH** – hormona adrenocorticotrópica

**ADN** – ácido desoxirribonucleico

**AR** – alisamento radicular

**BD** –  $\beta$ -defensina

**CDT** – distensora citoletal

**DM1** – diabetes mellitus tipo I

**DM2** – diabetes mellitus tipo II

**EGF** – fator de crescimento epidérmico

**GUNA** – gengivite ulcerativa necrosante aguda

**HbA1c** – hemoglobina glicosilada A1c

**HS** – hemorragia à sondagem

**ICAMs** – moléculas de adesão intercelular

**Ig** – imunoglobulina

**IG** – índice gengival

**IHOS** – índice de higiene oral simplificado

**IL** – interleucinas

**IP** – índice de placa

**JAC** – junção amelo-cementária

**LBP** – proteína ligante de lipossacarídeo

**LPS** – lipopolissacarídeo

**Lts** – leucotoxinas

**MAPK** – proteína quinase ativada por mitógenos

**MMP** – metaloproteases da matriz

**mRNA** - ácido ribonucleico mensageiro

**NIP** – nível de inserção periodontal

**OPG** – osteoprotegerina

**PGE<sub>2</sub>** – prostaglandina E2

**PMNL** – leucócitos polimorfonucleares

**PS** – profundidade de sondagem

**PUNA** – periodontite ulcerativa necrosante aguda

**RANK** - ativador do ligante ao fator nuclear  $\kappa$ B

**RANKL** - recetor ativador do ligante ao fator nuclear  $\kappa$ B

**Redox** – oxidação-redução

**SNP** – polimorfismo nucleotídico único

**spp.** – espécies

**Tc** – linfócitos T citotóxicos

**TLR** – recetores do tipo Toll

**TNF** – fator de necrose tumoral

**Treg** – linfócitos T reguladores



## I - Introdução

A doença periodontal envolve todas as doenças que afetam um ou mais componentes do periodonto, o que inclui a gengiva, o ligamento periodontal, o cimento e o osso alveolar (Azodo CC, 2015). A doença periodontal na sua forma crónica é uma preocupação crescente na população, nos sistemas de saúde e sociedade em todo o mundo. Constitui uma das maiores preocupações de saúde oral a nível global e é uma causa significativa de perda dentária e do edentulismo, total e parcial, em 5 a 20% da população adulta mundial.

Esta doença é causada por desordens inflamatórias provocadas por uma microbiota patogénica no biofilme subgengival, que inclui a *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a *Tannerella forsythia* e a *Treponema denticola* que desencadeiam as respostas imunes inata, adaptativa e inflamatória (Silva et al., 2015). Estes processos resultam na destruição dos tecidos que envolvem e suportam os dentes, e eventualmente na perda dos tecidos, osso e finalmente, dos dentes.

A presença de periodontopatogénios é mandatária, mas por si só, insuficiente para a iniciação da doença periodontal (Cifcibasi et al., 2015). O início e progressão da doença periodontal estão dependentes de interações complexas entre as bactérias periodontopatogénicas e o sistema imune do hospedeiro. As células imunitárias incluem neutrófilos, monócitos e macrófagos, que são a primeira linha de resposta imunitária no combate aos agentes infecciosos. Estas células do sistema imunitário estão envolvidas tanto no desenvolvimento da periodontite crónica como na periodontite agressiva. Da mesma forma que acontece em outras infeções, a identificação dos patogénios microbianos associados à periodontite é o primeiro passo em direção ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas (Pérez-Chaparro et al., 2014). Tal como determinam os postulados de Koch, para identificar os microrganismos patogénicos específicos, deve-se primeiro caracterizar a sua prevalência em situações de doença e de saúde, e em seguida perceber se a sua eliminação, supressão ou redução impede a progressão da doença.

O conceito atual de etiologia da doença periodontal considera que são precisos três fatores para que a doença ocorra: (1) suscetibilidade do hospedeiro; (2) presença de

bactérias patogénicas; e (3) ausência de bactérias consideradas comensais (Nadkerny, Ravishankar, Pramod, Agarwal e Bhandari, 2015).

Doenças como a gengivite e a periodontite, e as cáries dentárias estão associadas a uma mudança progressiva da flora microbiológica do biofilme oral designada genericamente por disbiose (Gruner, Paris e Schwendicke, 2016).

Os probióticos são definidos como “organismos vivos que administrados em quantidades adequadas podem contribuir para a promoção da saúde do hospedeiro” (Gruner et al., 2016). Os efeitos antibacterianos dos probióticos (por meio da via de coagregação, produção de produtos tóxicos e por competição por substratos) promovem a estabilização da flora e a modulação do sistema imunitário do hospedeiro que poderão ter efeitos benéficos no tratamento e prevenção da doença periodontal. As bactérias mais estudadas com potencial probiótico são os *Lactobacilus spp.*, alguns *Streptococcus spp.* e as *Bifidobacterium spp.*.

Neste trabalho começa-se por se caracterizar o periodonto e a sua constituição no estado de saúde. Seguidamente é efetuada uma contextualização histórica da classificação da doença periodontal, incidindo no que se pode considerar doença periodontal e os vários tipos de doença, segundo vários parâmetros que se foram alterando até aos dias de hoje. Em seguida revê-se os métodos de diagnóstico da doença periodontal, caracteriza-se clinicamente os vários estádios de evolução da doença distinguindo as várias formas de gengivite e de periodontite, e discute-se a etiologia, a patogénese, os fatores de risco e os vários tratamentos disponíveis principais e coadjuvantes. Finalmente caracterizam-se os probióticos e os seus mecanismos de ação, e o seu potencial papel na prevenção e tratamento da doença periodontal.

A elaboração deste trabalho envolveu uma pesquisa de artigos publicados nos últimos 5 anos através da Pubmed, B-on, Wiley Online Library e Google Académico. Foram utilizadas as seguintes palavras-chave: periodontite, tratamento, doença periodontal, microbioma oral e probióticos. A pesquisa deu origem a 152 referências bibliográficas arquivadas numa base de dados Mendeley. Foram recolhidos e lidos 75 artigos. Foram ainda consultados artigos de datas anteriores com a finalidade de contextualização histórica.

## II – Desenvolvimento

### 1. Doença Periodontal

O periodonto compreende os seguintes tecidos: (1) a gengiva, (2) o ligamento periodontal, (3) o cimento e (4) o osso alveolar (Figura 1). O osso alveolar é constituído por duas componentes, o osso alveolar propriamente dito e o processo alveolar. Considera-se o osso alveolar as paredes ósseas que contêm as cavidades dentárias na maxila e na mandíbula. O osso alveolar propriamente dito é contínuo com o processo alveolar e forma uma zona fina que reveste o alvéolo do dente. A principal função do periodonto consiste em ligar o dente ao tecido ósseo das maxilas e manter a integridade da superfície mucosa mastigatória da cavidade oral. O periodonto constitui um desenvolvimento biológico e funcional que sofre algumas alterações com a idade e está sujeito a alterações morfológicas relacionadas com alterações funcionais e alterações no ambiente bucal (Lindhe, 2008).

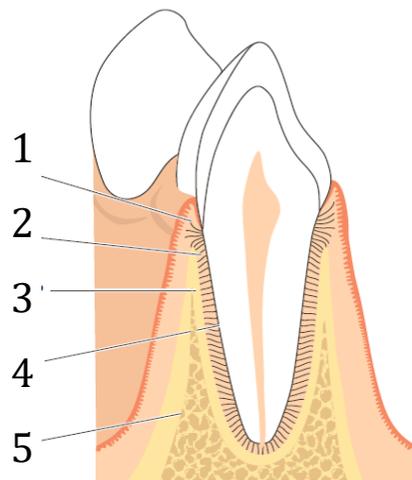


Figura 1 - Constituintes do periodonto: (1) gengiva; (2) ligamento periodontal; (3) osso alveolar propriamente dito; (4) cimento; (5) osso alveolar. Retirada e adaptada de: livro “*Clinical Periodontology and Implant Dentistry*” 5ª Edição Lindhe, (2008)

A doença periodontal é o resultado da acumulação de placa subgengival que causa uma alteração na microflora, desde o estado de saúde até à doença. A gengivite é a forma inicial de doença periodontal, enquanto a periodontite, é a forma mais severa e

irreversível da infecção que afeta os tecidos que suportam as estruturas dentárias (Zarco, Vess e Ginsburg, 2012). A remoção da placa dentária do biofilme microbiano que envolve o dente e a superfície radicular, reduz eficazmente tanto a gengivite como a periodontite, o que demonstra que os microrganismos orais são cruciais para o desenvolvimento da doença periodontal (Roberts e Darveau, 2015).

A cavidade oral possibilita um ambiente ecológico ideal para que a comunidade bacteriana possa prosperar. É um ambiente com abundante nutrição, temperatura ideal, superfícies dentárias de fácil adesão, bem como um potencial de oxidação-redução (redox) na gengiva diferente do sulco ou bolsa periodontal, o que contribui para a sustentação de espécies microbianas aeróbicas e anaeróbicas (Singh, Sharma e Shreehari, 2015). A cavidade oral humana é composta por vírus, protozoários, fungos, arqueobactérias e, sobretudo, bactérias. As comunidades bacterianas encontradas nesta região corporal são altamente complexas com a estimativa da presença de cerca de 1000 espécies de bactérias (Wade, 2013).

O microbioma oral sofre alterações da sua composição desde o nascimento (Krishnan, Chen e Paster, 2016). As espécies pioneiras a colonizar a cavidade oral normalmente são *Streptococcus spp.*, em que o *Streptococcus salivarius* é encontrado maioritariamente no dorso da língua e na saliva, o *Streptococcus mitis* na mucosa bucal e o *Streptococcus sanguinis* nos dentes. A multiplicação e metabolismo destas espécies pioneiras promove uma alteração da ecologia local e de condições como o pH, potencial redox, coagregação e disponibilidade de nutrientes permitindo assim que outras espécies possam colonizar posteriormente. Ao longo do tempo, outras bactérias conseguem instalar-se, incluindo a *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella spp.*, *Neisseria spp.* e a *Prevotella spp.*. O desenvolvimento dentário e a respetiva erupção cria um novo habitat, o sulco gengival, que contém o fluido gengival, e com isso aumenta a presença de géneros como a *Leptotricia spp.* e *Campylobacter spp.*, que é observada com a colonização de *Prevotella denticola* e membros de *Fusobacterium spp.* e *Selenomonas genera*. Juntamente com a saliva, o fluido gengival é um elemento crítico na manutenção da integridade gengival. Este fluido contém péptidos antimicrobianos, imunoglobulinas, uma diversidade de outras proteínas ativas que influenciam a ecologia da cavidade oral, e ainda nutrientes que suportam a microflora residente. A

contínua sucessão de complexos dá origem a uma comunidade microbiana homeostaticamente mais estável que é referida por vezes como “comunidade perfeita”, em que diferentes bactérias interagem de forma a estabelecer um ecossistema em que cada comunidade contribui de alguma forma para um ambiente simbiótico (Krishnan et al., 2016).

No estado de saúde o microbioma oral é semelhante entre indivíduos, as espécies e filotipos mais comuns são *Streptococcus spp.*, *Granulicatella spp.*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Rothia spp.*, *Actinomyces spp.*, *Prevotella spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Porphyromonas spp.* e *Fusobacterium spp.* (Wade, 2013). As espécies tipicamente associadas à periodontite e cárie dentária não estão presentes em indivíduos saudáveis.

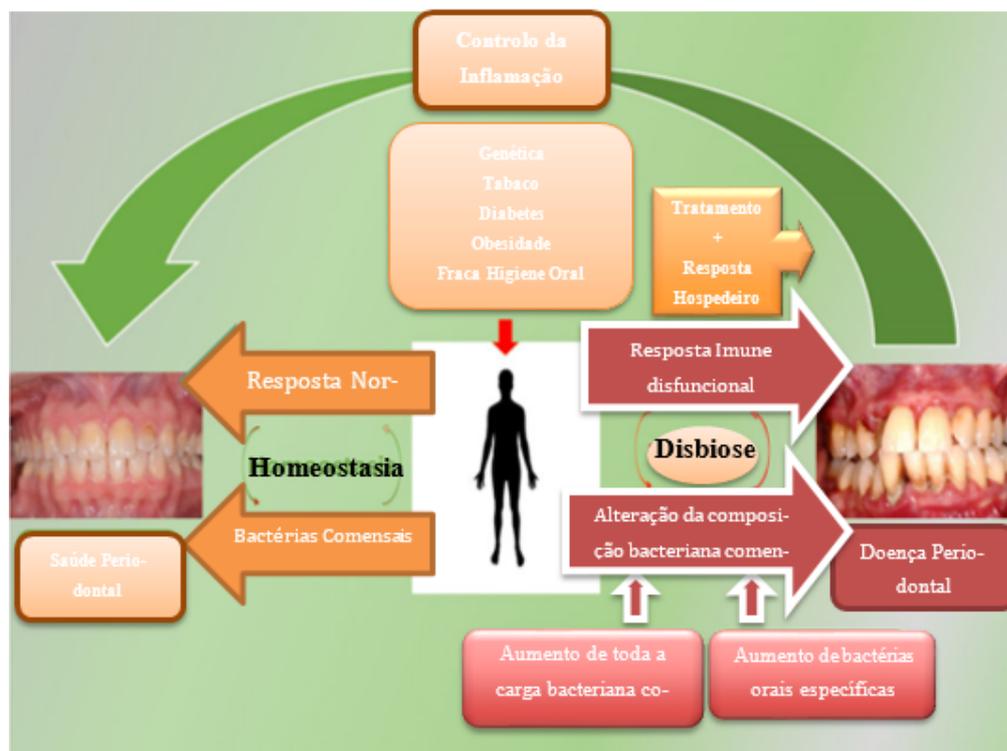


Figura 2 - Saúde periodontal e doença em função da comunidade oral periodontal e a resposta do hospedeiro. Retirada e adaptada de: artigo “*Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: Symbiosis and dysbiosis*” Roberts e Darveau, 2015.

Vários autores referem-se ao conceito de disbiose quando abordam a etiopatogenia da doença periodontal (Figura 2). Segundo este conceito, algumas patologias surgem

por uma diminuição no número de organismos benéficos e/ou aumento no número de agentes patogénicos (Berezow e Darveau, 2011). Nas doenças periodontais ocorre uma mudança na flora gengival/periodontal, passando ao predomínio de bactérias gram-negativas em oposição ao estado de saúde, em que predominam bactérias gram-positivas.

## **1.1. História da classificação da doença periodontal**

O começo das investigações microbiológicas teve início com as primeiras observações de bactérias por parte de van Leeuwenhoek (1632-1723) através do uso de um microscópio primitivo (Kuramitsu, He, Lux, Anderson e Shi, 2007). Nas suas anotações escreveu “eu não limpei os meus dentes por três dias e então tirei o material que estava depositado em pequenas quantidades nas gengivas acima dos meus dentes da frente... Eu encontrei alguns animálculos vivos.”. Os micróbios desenhados no seu bloco de notas são agora conhecidos como as bactérias mais abundantes na cavidade oral, incluindo cocus, bactérias fusiformes e espiroquetas. W. D Miller, foi o seguinte indivíduo de relevo no grande avanço da microbiologia oral. Ao exercer a profissão de médico dentista, ele passava as tardes e fins-de-semana no laboratório de Robert Koch com o objetivo de identificar “germes” que fossem responsáveis pela queda de dentes. Publicou em 1890, um livro de título “*Microrganismos da Boca Humana*”, em que propõe uma teoria químico-parasítica que sugere que a placa dentária é constituída por microrganismos. Em hospedeiros suscetíveis que frequentemente consomem hidratos de carbono, os microrganismos dessa placa dentária iriam converter os hidratos de carbono em ácidos, o que resultaria na desmineralização dentária (Kuramitsu et al., 2007).

Durante o século XIX e a primeira metade do século XX, a visão prevalente do que é agora classificado como periodontite crónica era como uma doença não inflamatória. A patogénese da periodontite em adultos era vista como principalmente desenvolvida por uma bolsa patológica e atrofia óssea alveolar atribuída maioritariamente a trauma por oclusão, enquanto a inflamação e infeção bacteriana eram vistas como ações secundárias. Com base em observações histológicas, Gottlieb usou o termo “atrofia alveolar óssea difusa” para descrever a doença, e colocou a hipótese de que a causa era

“falta de uma barreira de cimento efetiva”, que era chamada de cimentopatia e poderia levar à recessão gengival, perda óssea alveolar e formação de bolsas patológicas (Albandar, 2014). Em 1942, Orban & Weinmann introduziram o termo “periodontose” para descrever a doença periodontal severa em indivíduos jovens. Em 1950, foi reportada pela Academia Americana de Periodontologia (AAP), a definição de periodontose como “destruição degenerativa e não inflamatória do periodonto originada em uma ou mais estruturas periodontais, caracterizada pela migração e mobilidade dos dentes na presença ou ausência de proliferação epitelial secundária e formação de bolsas ou doença gengival secundária” (Albandar, 2014).

John W Riggs (1811-1885), uma autoridade no tratamento da doença periodontal, reconheceu a clara importância dos irritantes locais na etiologia desta doença. Apesar das poucas publicações, palestrou extensamente sobre o tratamento periodontal com ênfase na remoção dos fatores locais ao invés dos fatores sistêmicos. Pelo que durante muitos anos, na América principalmente, a periodontite era conhecida como “doença de Riggs” (Highfield, 2009). No século XIX, pouco era conhecido relativamente à etiologia e patogenia das doenças periodontais, pelo que a sua classificação inicial foi efetuada com base nas características clínicas. Desde o início do século XX que se reconhece que clinicamente há diferentes tipos de doença periodontal e vários foram os que os tentaram definir. Em 1942 a doença periodontal foi então classificada por Orban com base nos princípios da patologia. Esta classificação foi aceite pela Academia Americana de Periodontologia e consistia na diferenciação pelas seguintes causas patológicas: (1) inflamatória, (2) distrófica e (3) traumática; dentro destes efetuou-se a subdivisão da periodontite simples – secundária à gengivite e caracterizada por perda óssea, bolsas, abscessos e depósitos de cálculo – e complexa – secundária à periodontose, que era considerada uma doença degenerativa, com fatores etiológicos semelhantes à periodontite mas com pouco ou nenhum cálculo. Desde 1970 até à atualidade, Armitage estabeleceu o paradigma infecção/reposta do hospedeiro que se tornou dominante. Isto resultou no desenvolvimento do conceito de que a periodontite compreende um espectro de doenças relacionadas mas distintas, que diferem na sua etiologia, história natural de progressão e resposta ao tratamento (Newman, Takei, Klokkevold e Carranza, 2012). Em 1982, Page e Schroeder afirmaram conseguir identificar pelo menos cinco formas diferentes de periodontite em humanos. Designaram as formas de periodontite como pré-pubertária,

juvenil, rapidamente progressiva, adulta e gengivite/periodontite ulcerativa necrosante aguda. Em Novembro de 1986, a AAP adotou a nova classificação nos seguintes grupos (Newman et al., 2012):

- I. Periodontite Juvenil
  - a. Pré-pubertária
  - b. Localizada
  - c. Generalizada
- II. Periodontite do adulto
- III. Gengivo-periodontite ulcerativa necrosante
- IV. Periodontite refratária

Em 1999, a AAP efetuou uma revisão na classificação que resultou na classificação utilizada até aos dias de hoje (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação das doenças periodontais segundo a AAP, 1999.

<b><u>Gengivite</u></b>	<p><u>Induzida por placa dentária:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Exclusivamente associada a placa dentária</u></li> <li>• <u>Modificada por fatores sistémicos</u></li> <li>• <u>Modificada por fármacos</u></li> <li>• <u>Modificada por malnutrição</u></li> </ul> <p><u>Não induzida por placa dentária</u></p>
<b><u>Periodontite Crónica</u></b>	<p><u>Localizada</u></p> <p><u>Generalizada</u></p>
<b><u>Periodontite Agressiva</u></b>	<p><u>Associada a desordens hematológicas</u></p> <p><u>Associada a desordens genéticas</u></p> <p><u>Sem associação específica</u></p>
<b><u>Doenças Periodontais Necrosantes</u></b>	<p><u>Gengivite Ulcerativa Necrosante (GUN)</u></p> <p><u>Periodontite Ulcerativa Necrosante (PUN)</u></p>
<b><u>Abcessos Periodontais</u></b>	<p><u>Gengival</u></p> <p><u>Periodontal</u></p> <p><u>Pericoronal</u></p>
<b><u>Periodontite associada a lesões endodônticas</u></b>	

## 1.2. Diagnóstico da doença periodontal

O diagnóstico clínico da doença periodontal é efetuado pelo reconhecimento de vários sinais e sintomas nos tecidos periodontais que distinguem de saúde. No caso da doença periodontal, é necessário o conhecimento dos constituintes periodontais no estado de saúde (Newman, Takei, Klokkevold e Carranza, 2015). O periodonto saudável, em que só é possível observar diretamente os tecidos gengivais, é descrito como: (1) a gengiva é pontilhada, rosa pálido ou rosa coral, em caucasianos, com várias variações de pigmentação em outras etnias (Figura 3); (2) a gengiva está justamente adaptada aos tecidos adjacentes, com uma margem em ponta de faca onde circunda o dente; (3) a margem gengival encontra-se ao nível da junção amelo-cementária (JAC) com uma configuração recortada, em que a porção mais elevada se encontra a nível da papila interdentária e a um nível baixo a margem vestibular/lingual; (4) há um sulco gengival que circunda o dente, que deve ter 0,5 a 3mm de profundidade e ausência de sangramento nesta localização com sondagem suave, deve apenas existir uma pequena quantidade de fluido gengival; (5) a parede lateral do sulco constitui a margem gengival livre, da extensão mais apical desta parede até à junção mucogengival está a gengiva aderida que deve ter uma largura de 1 a 9 mm e uma superfície pontilhada; (6) a gengiva é um tecido firmemente imobilizado ligado para baixo com osso por um mucoperioste e uma mucosa queratinizada adaptada para resistir a lesões. Assim, algumas variações destas características podem ser indicativos da presença de doença periodontal.



Figura 3 – Caracterização clínica da gengiva. A – gengiva normal de jovem adulto; B – gengiva ligeiramente melanótica (pigmentada) de adulto. Retirada e adaptada de: livro “*Carranza’s Clinical Periodontology*” Newman et al., (2015) página 20.

Alterações gengivais como a cor, o contorno, textura e a presença de hemorragia à sondagem nos tecidos gengivais permitem o diagnóstico de doenças gengivais induzidas por placa (Highfield, 2009). As doenças gengivais não induzidas por placa podem precisar de investigações a nível histopatológico, microbiológico ou serológico de forma a obter um diagnóstico. A periodontite é diagnosticada pela presença de alterações gengivais – mesmos parâmetros para o diagnóstico da gengivite – associada à presença de redução da resistência dos tecidos do periodonto à sondagem com sulcos gengivais ou bolsas mais profundas o que reflete a perda de inserção periodontal. É importante reconhecer que as bolsas podem ter uma dimensão horizontal ou vertical, pelo que os clínicos na execução da sondagem para a avaliação da perda de inserção devem ser cautelosos nos envoltimentos de furca. A deteção da perda de inserção nas localizações de furca requer o conhecimento da anatomia dentária e da furca, especialmente nos dentes multirradiculares (Highfield, 2009). É também essencial a mobilidade e migração dentária, estes parâmetros são normalmente resultado de sintomas tardios relacionados com a periodontite, e possivelmente os mais importantes para o prognóstico e tratamento da doença. A mobilidade só por si, não serve de diagnóstico para a periodontite, pois pode resultar de trauma oclusal, tal como a migração dentária que pode ser segmentar ou unitária. A história familiar e fatores de risco modificáveis, tal como o tabagismo, *stress*, drogas ou hormonas sexuais, são de relevo pois afetam a evolução de todos os tipos de doença periodontal. As radiografias – ortopantomografias + periapicais – fornecem um método de diagnóstico secundário e podem demonstrar a presença de perda óssea marginal, assim confirmando a perda de inserção.

A técnica tradicional de diagnóstico da periodontite é a através da sondagem com uma sonda calibrada, de forma a detetar a presença ou progressão de algumas doenças periodontais, como a periodontite crónica, ao avaliar numericamente e/ou clinicamente os sinais de inflamação, esta avaliação pode ser suportada por evidência radiográfica (Andrade, Espinoza, Gómez, Espinoza e Cruz, 2012). Os parâmetros comuns incluem a profundidade de sondagem, nível da margem gengival, presença ou ausência de hemorragia (IG), presença de placa (IP), e nível clínico de inserção periodontal (NIP). Quanto mais exatos são os objetos de medição, maior reprodutibilidade terão as medições obtidas, adicionalmente, é necessário um elevado nível de controlo das variáveis que afetam as sondagens. Alguns dos fatores que podem influenciar a sondagem

periodontal são: presença de gengivais aumentadas de volume, próteses dentárias, cálculo dentário, diâmetro e/ou variações das marcas estandardizadas da sonda, e ainda variações na força aplicada entre clínicos. Os diferentes resultados podem levar a más interpretações de diagnóstico da verdadeira condição periodontal, resultando na falta ou no excesso de tratamento (Andrade et al., 2012).

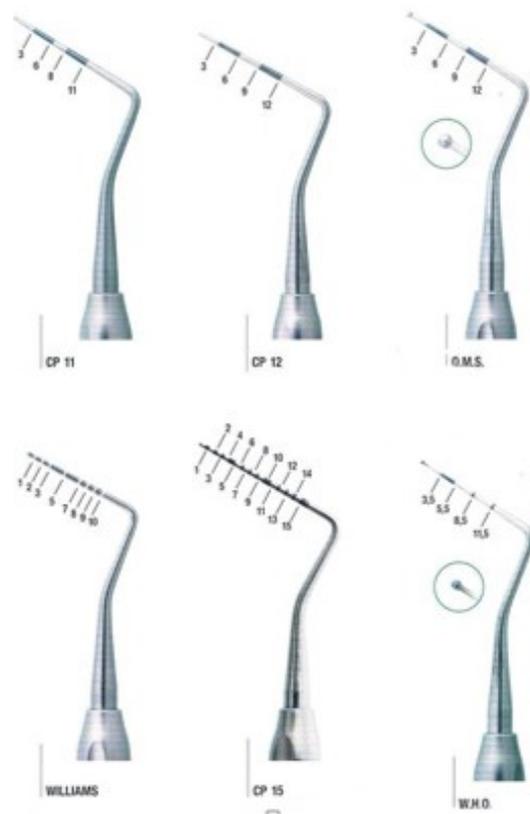


Figura 4 - Modelos de sondas periodontais. Retirada e adaptada de: página de internet "Dental Quirúrgic's"

A Organização Mundial de Saúde desenvolveu uma sonda, desenhada especificamente para o diagnóstico desta doença. A sonda tem uma ponta em bola de 0,5mm (para minimizar a penetração da sonda nos tecidos moles e para ajudar a detetar cálculo), uma banda preta entre os 3,5mm e os 5,5mm, e anéis aos 8,5mm e aos 11,5mm (Figura 4). Uma variedade de sondas periodontais foram criadas para este propósito, como é o caso da sonda de Williams ou da sonda computadorizada da Florida. A força aplicada na sondagem pode influenciar as medidas, tal como o grau de inflamação nas doenças gengivais e periodontais (Preshaw, 2015). No geral, a força ideal a ser aplicada foi determinada como cerca de 0,20 a 0,25 Newtons que é aproximadamente 0,20 a 0,25g.

Para ser mais fácil ao clínico saber se está a exercer a força correta, esta força é comparada com a pressão necessária a fazer com a sonda na unha de forma a esbranquiçar os tecidos baixo da unha; ou a pressão necessária para deprimir a pele na almofada do dedo cerca de 1mm. A sondagem deve ser efetuada em 6 localizações por dente (mesio-vestibular, centro-vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, centro-lingual, disto-lingual) de forma a avaliar a perda de inserção ao redor do dente (Preshaw, 2015). A hemorragia à sondagem deve ser apontada como presente ou ausente em cada localização seguida à sondagem, pois fornece (apesar de limitada) a informação relativa ao grau de inflamação dos tecidos periodontais. A presença de hemorragia em localizações isoladas não é um bom indicativo de inflamação ativa ou risco de progressão de doença, no entanto a ausência é um bom indicador de saúde periodontal e estabilidade tecidular. Por outro lado, a persistente hemorragia à sondagem nas localizações que também demonstram um aumento da profundidade de sondagem é um forte indicador para a futura progressão da doença. Ainda, em pacientes que se encontram em manutenção periodontal, se apresentarem hemorragia persistente à sondagem em visitas de manutenção sucessivas, é sinal que há risco para a continuação da progressão da doença periodontal (Preshaw, 2015).

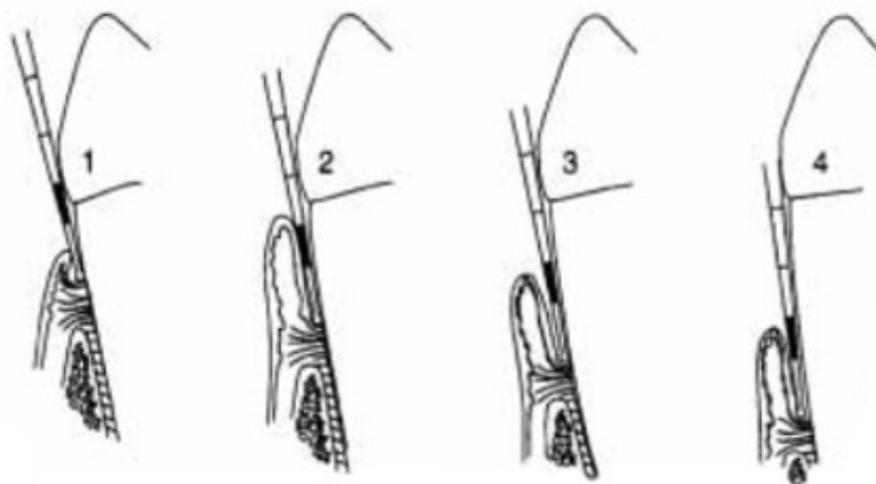


Figura 5 - Representação de sondagem com vários resultados de perda de inserção periodontal. Retirada e adaptada de: “*Oral Health Surveys*” (WHO, 2013)

A forma de periodontite mais comum – periodontite crónica – pode ser dividida de acordo com a sua extensão e severidade (Tabela 1). Assim sendo, o que diferencia a

periodontite crónica generalizada da localizada é se estão presentes ou não mais de 30% de localizações afetadas com perda de inserção periodontal. A classificação da severidade da periodontite crónica está relacionada com o nível de perda de inserção periodontal (profundidade de sondagem + recessão gengival) em que os valores são classificados como: 1 a 2 mm – ligeira; 3 a 4mm – moderada;  $\geq 5$ mm – severa (Figura 5) (Kowalski e Gerska, 2014). Quanto à profundidade de sondagem valores  $>3$ mm e  $<5$ mm – ligeira;  $\geq 5$ mm e  $<7$ mm – moderada e  $\geq 7$ mm – severa (Figura 6) (Goldie, 2015). A profundidade de sondagem corresponde à distância desde o fundo da bolsa (epitélio de união) até à margem gengival e a recessão gengival é à distância desde a margem gengival até à JAC, ambos podem ser medidos com uma sonda periodontal graduada (Kowalski e Gerska, 2014).

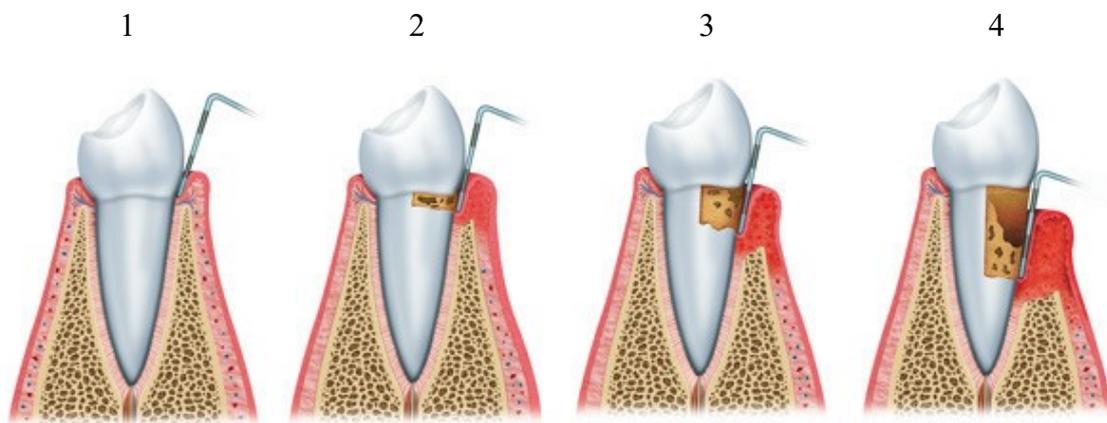


Figura 6 – Sondagem periodontal efetuada com sonda graduada numa bolsa periodontal. 1 – gengivite; 2 – periodontite ligeira; 3 – periodontite moderada; 4 – periodontite severa. Retirada e adaptada de: <http://www.clinicadentalruiz.com/esp%C3%B1ol/tratamientos/periodoncia/>

A perda de inserção óssea alveolar pode resultar no aumento da mobilidade dentária (Preshaw, 2015). Este parâmetro deve ser avaliado como instrumentos rígidos (como o fim do cabo do espelho) e deve ser atribuída um valor ao dente afetado. O sistema de marcação de mobilidade dentária mais comum é: grau I: mobilidade superior à mobilidade fisiológica – geralmente considerada  $<0,2$  no sentido horizontal – mas menor que 1mm no sentido horizontal; grau II: mobilidade horizontal  $> 1$ mm; grau III: mobilidade vertical. A classificação mobilidade pode ajudar na previsão do prognóstico de manutenção dentária, em que o grau III corresponde ao pior prognóstico.

### 1.3. Gengivite

A gengivite é considerada a inflamação do tecido gengival sem que esteja associada à migração apical do epitélio de união ou com a destruição do osso e/ou das fibras do ligamento periodontal (Wade, 2013) (Figura 7).

Inicialmente, ocorre uma colonização bacteriana ao nível da película salivar aderida à superfície dentária (composta por proteínas e glicoproteínas de origem salivar), que na ineficácia ou inexistência de um controlo da placa bacteriana adequado por parte do hospedeiro, procuram o crescimento e a proliferação de bactérias dando origem a uma estrutura complexa de nome biofilme bacteriano (Wade, 2013). Ao constituírem a forma de biofilme originam a forma patogénica característica, inflamando a gengiva (Zarco et al., 2012). Wade (2013) demonstrou que não existem bactérias específicas associadas à gengivite, no entanto a quantidade de placa bacteriana presente, o seu estado de desenvolvimento e a sua deposição estão relacionados com a severidade da doença.



Figura 7 – Fotografia de jovem adulto de 22 anos com gengivite. Gengiva aumentada de volume característico de inflamação e coloração mais avermelhada.

A placa dentária começa então a formar-se sobre a película salivar aderida aos dentes que contém numerosos recetores, que são reconhecidos pelas bactérias colonizadoras (Singh et al., 2015). A maior parte destes recetores são estaterinas, proteínas ricas em prolina,  $\alpha$ -amilase salivar, mucinas sialiladas e aglutininas salivares, produzidas pelo



(Wade, 2013). Esta irritação e inflamação, que ocorrem ao nível dos tecidos moles envolvem alterações clínicas do volume tecidual, da forma, da morfologia e da textura gengival. Os sinais clínicos de presença de gengivite são gengivas aumentadas e inflamadas que podem sangrar à sondagem ou espontaneamente (Wade, 2013).

A gengivite ulcerativa necrosante aguda (GUNA; Figura 9) está associada a uma pobre higiene oral e na fraqueza do hospedeiro, especialmente em pacientes imunocomprometidos, malnutrição ou condições de vida precárias, bem como no contexto de stress mental (Mizrahi, 2014). Esta doença é mais frequentemente encontrada em jovens adultos, mas há ainda alguma evidência em casos de crianças malnutridas. O seu diagnóstico é baseado em três sintomas fundamentais: (1) aumento gengival, (2) hemorragia gengival, e (3) ulceração e necrose interpapilar (característico). Esta condição é considerada, como uma etiologia inicial claramente infecciosa, em que as principais bactérias associadas incluem as *Bacteroides intermedius* e *Fusobacterium spp.*. A infecção envolve bactérias tanto anaeróbicas como aeróbicas, havendo uma maior percentagem de bactérias gram-negativas (Mizrahi, 2014).



Figura 9 - Imagem de cavidade oral de paciente com o estado de doença Gengivite Ulcerativa Necrosante Aguda. Retirada e adaptada de: panfleto da empresa farmacêutica DEHON

## 1.4. Periodontite e lesões periodontais

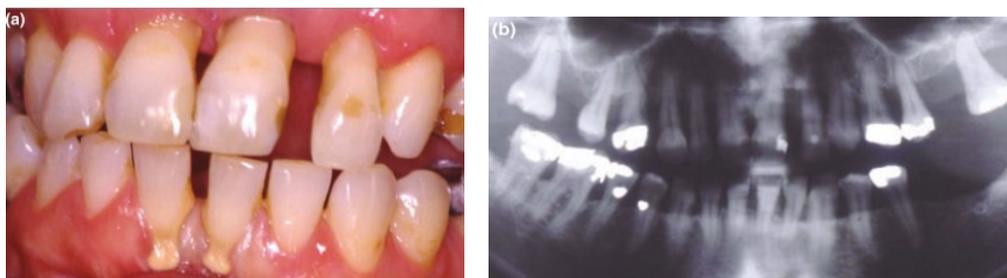


Figura 10 - Fotografia de paciente com periodontite crônica (a) e radiografia ortopantomografia do mesmo paciente (b). Retirada e adaptada de: artigo “*Diagnosis and classification of periodontal disease*” (Highfield, 2009)

A periodontite é uma doença crônica inflamatória associada à placa subgingival, sendo uma das grandes causas de perda dentária e com uma elevada prevalência (Figura 10). Esta doença pode apresentar uma etiologia multifactorial, em que as mais estudadas são a de origem bacteriana e origem imunológica. O fator microbiológico contribui para que ocorra a doença na medida em que há uma alteração dos constituintes da microflora oral, enquanto o fator de resposta imunológica primária é a resposta inflamatória destrutiva induzida pelo hospedeiro. Além de afetar os tecidos de suporte dentário (periodonto), pode também exercer um impacto adverso na saúde sistêmica (Berezow e Darveau, 2011; Maekawa e Hajishengallis, 2014).

No estado de saúde a microflora residente/comensal impede que potenciais micróbios patogênicos possam multiplicar-se e crescer na cavidade oral, e regular de forma positiva a resposta inflamatória do hospedeiro (Singh et al., 2015). A composição do biofilme oral é significativamente diferente nos indivíduos saudáveis e nos doentes com periodontite em que a doença é caracterizada por um progresso do processo inflamatório que destrói o tecido periodontal (Roberts e Darveau, 2015). O microbioma patogénico liberta enzimas proteolíticas, que destroem o tecido do hospedeiro e pode resultar na inflamação gengival, perda de gengiva aderida, formação de bolsas periodontais e destruição dentária e alveolar (Zarco et al., 2012). Uma vez formadas as bolsas no periodonto, a periodontite é oficialmente irreversível, pois o periodonto uma vez separado não tem a capacidade de se aderir à superfície radicular com a mesma arquitetura e constituição tecidual que apresenta no estado de saúde (Zarco et al., 2012).



Figura 11 - Representação de periodontite agressiva generalizada. (a) fotografia frontal intra-oral aos 16 anos; (b) ortopantomografia aos 16 anos; (c) ortopantomografia aos 21 anos. Retirada e adaptada de: artigo “*Diagnosis and classification of periodontal disease*” (Highfield, 2009)

A classificação dos vários tipos de periodontite baseia-se em critérios clínicos e microbiológicos (Tabela 1). A periodontite agressiva tem vindo a ser diagnosticada geralmente em pacientes com hábitos de higiene adequados, com história familiar da doença, em que o nível de inserção clínico diminui rapidamente, e a resposta inflamatória observada não se justifica para os depósitos de biofilme presentes (Kowalski & Gerska, 2014)(Figura 11). Esta doença é caracterizada por uma microflora específica – elevadas proporções de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e, às vezes, *Porphyromonas gingivalis* -, uma resposta fenotípica exacerbada de macrófagos – níveis elevados de interleucina-1 $\beta$  e prostaglandina E2 – e tendência para a autolimitação. A periodontite agressiva pode ser considerada localizada ou generalizada, de acordo com o número de dentes envolvidos no processo periodontal destrutivo (Kowalski e Gerska, 2014). Esta forma da doença afeta normalmente apenas os incisivos e primeiros molares de adolescentes e jovens adultos (Krishnan et al., 2016). A falta de inflamação gengival mesmo com bolsas periodontais profundas é um sinal clínico comum nesta doença. Estudos recentes mostram que a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Filifactor alocis*, *Tannerella spp.*, *Solobacterium moorei*, *Parvimonas micra* e *Capnocytophaga spp.* são as mais abundantes na periodontite agressiva, e ainda que a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus parasanguinis* e a *Filifactor alocis* podem servir co-

mo biomarcadores para esta doença periodontal e prever a perda de osso antes da mesma acontecer (Krishnan et al., 2016).

Tabela 2 - Comparação do número de bactérias na Periodontite Agressiva Generalizada e Periodontite Crónica Generalizada. Retirada e adaptada de: artigo “*Clinical and microbiological evaluation of biofilme-gingival interface classification in patients with generalized forms of periodontitis*” (Kowalski e Gerska, 2014)

	Periodontite Agressiva Generalizada (nº de bactérias x 10 <sup>5</sup> ± desvio padrão)	Periodontite Crónica Generalizada (nº de bactérias x 10 <sup>5</sup> ± desvio padrão)
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	182.5 ± 486.5	5.2 ± 14.5
<i>Tannerella forsythia</i>	1382.4 ± 1477.0	1267.7 ± 2298.4
<i>Campulobacter rectus</i>	462.9 ± 365.6	248.3 ± 318.7
<i>Treponema denticola</i>	723.2 ± 959.3	778.7 ± 1438.6
<i>Eikenella corrodens</i>	312.3 ± 420.0	231.7 ± 456.9
<i>Prevotella intermedia</i>	432.2 ± 1300.1	446.1 ± 680.9
<i>Parvimonas micra</i>	710.4 ± 1321.9	1861.3 ± 4595.6
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1233.1 ± 2724.6	490.8 ± 850.9
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2251.5 ± 3023.9	1748.5 ± 2606.4

A Tabela 2 faz parte de um estudo recente pelos autores Kowalski e Gerska (2014), que pretendiam avaliar clínica e microbiologicamente o biofilme gengival e tentar classificar a partir destes parâmetros os pacientes portadores das duas formas distintas de periodontite generalizada (agressiva e crónica). Através do teste de Mann-Whitney observaram uma grande discrepância nos valores de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, o que sugere que esta espécie bacteriana está implicada na periodontite agressiva. No entanto, apesar de outros estudos indicarem que a periodontite agressiva generalizada está associada a um aumento do número de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, neste estudo verificou-se apenas em metade dos indivíduos.

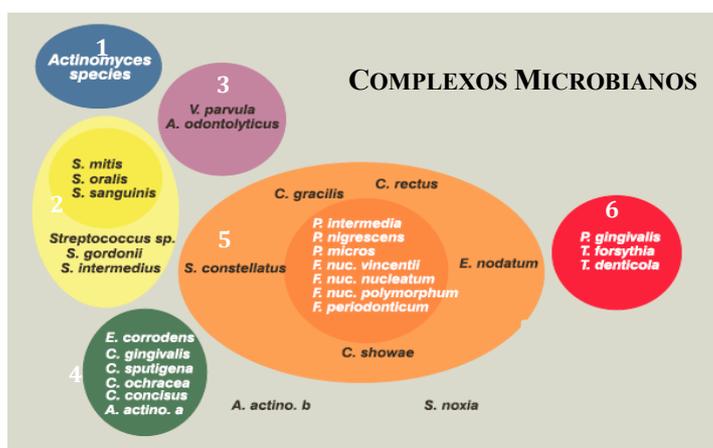


Figura 12 - Complexos microbianos. 1 – complexo azul, 2 – complexo amarelo, 3- complexo roxo, 4- complexo verde, 5 – complexo laranja, 6 – complexo vermelho. Retirada e adaptada de: livro “*Clinical Periodontology*” (Lindhe, 2008).

Após a quebra da relação de homeostasia, a relação disbiótica à medida do seu progresso no caminho de uma maior patogenicidade é caracterizada por distintos complexos microbiotas: (1) complexo azul – *Actinomyces spp.*; (2) complexo amarelo – *Streptococcus spp.*; (3) complexo verde – *Capnocytophaga spp.*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter spp.*, *Eikenella corrodens*; (4) complexo roxo – *Veillonella parvula*, *Actinomyces odontolyticus*; (5) complexo laranja – *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas intermedia*, *Porphyromonas nigrescens*; e (6) complexo vermelho – *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* (Figura 12)(Singh et al., 2015). Os microrganismos que correspondem aos colonizadores secundários fazem parte dos complexos verde, laranja e vermelho e são considerados os mais patogênicos. O complexo vermelho, em particular, é frequentemente observado em pacientes que demonstram hemorragia à sondagem, um parâmetro importante na fase destrutiva ativa das doenças periodontais (Singh et al., 2015).

No caso da periodontite crônica, os patogênicos putativos que estão há muito associados a este estado de doença periodontal, incluem a *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, e espécies de *Treponema spp.* e *Prevotella spp.*. Ainda assim, alguns autores defendem que as doenças orais estão melhor definidas com base em combinações de espécies ou complexos, ao invés

de uma espécie singular etiológica específica. Esta hipótese defende a teoria dos seis complexos microbianos, em que o complexo vermelho é o mais patogénico, contendo *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, e *Treponema denticola* que dependem da colonização primária da bolsa pelo complexo laranja (Krishnan et al., 2016)(Figura 12). Uma revisão bibliográfica suporta uma evidência moderada para a associação de 17 novas espécies/filotipos do domínio *Bacteria*, da filo *Candidatus Saccharibacteria* (TM7) e do domínio *Archaea* como etiologia da periodontite (Pérez-Chaparro et al., 2014).



Figura 13 - Fotografia de paciente com periodontite aguda ulcerativa necrosante. Retirada e adaptada de: artigo “*Diagnosis and classification of periodontal disease*” (Highfield, 2009)

A periodontite ulcerativa necrosante aguda (PUNA) é outra manifestação da doença periodontal, distinta e específica, caracterizada pelo rápido progresso da ulceração interpapilar e assim alastrando-se até à margem gengival, levando à aguda destruição dos tecidos periodontais (Zia, Andrabi, Qadri e Bey, 2015)(Figura 13). Tal como a GUNA, está associada a debilidade no hospedeiro, quer por malnutrição, *stress* psicológico, condições debilitante (como pacientes imunocomprometidos) e a uma má higiene oral. A etiologia das lesões necrosantes é em parte desconhecida, sabe-se no entanto que a infeção fuso-espiroquetal (caracterizada pela presença de fuso espiroquetas como *Treponema spp* e *Borrelia spp*) juntamente com um sistema imunitário deprimido, tem um papel major na patogenicidade destas doenças (Zia et al., 2015).



Figura 14 – Abscesso periodontal. Retirada e adaptada de: “How do I Manage a Patient with Periodontal Abscess?” (Marquez, 2013)

O abscesso periodontal é uma lesão infecciosa purulenta, localizada nos tecidos periodontais adjacentes à bolsa que pode levar à destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar (Marquez, 2013)(Figura 14). O abscesso relacionado com a periodontite pode ocorrer devido a uma exacerbação aguda da periodontite crônica não tratada, ou como consequência do tratamento dessa mesma doença.

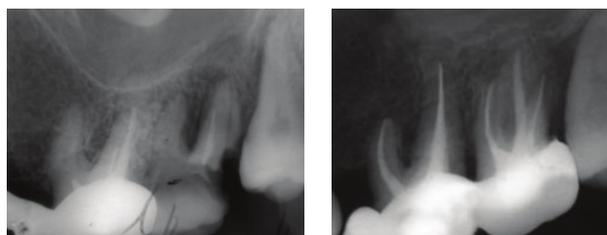


Figura 15 – Lesão Endo-Perio (Esquerda) e Tratamento Endo-Perio (Direita). Retirada e adaptada: artigo “Endo-periodontal lesion-endodontic approach” (Jivoinovici et al., 2014)

As lesões periodontais associadas a lesões endodônticas, são outro tipo de lesão que podem levar à perda de osso alveolar e dos tecidos periodontais, ou seja é um fator de risco para a progressão da periodontite (Jivoinovici et al., 2014) (Figura 15). Este tipo de lesão ocorre normalmente devido à ligação entre o meio endodôntico e o periodonto, que aquando da lesão endodôntica, permite a passagem de patógenos até ao periodonto. Os agentes patogénios responsáveis por estas lesões não são muito diferentes dos responsáveis pela periodontite comum, incluindo *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Tannerella forsythia*, *Dialister spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Treponema spp.*, bacilos anaeróbios gram-positivos (exemplo: *Actinomyces spp.*, *Eubacterium spp.*) e cocos gram-positivos (exemplo: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*).

## 1.5. Epidemiologia

A doença periodontal juntamente com as cáries dentárias representam a maior parte das doenças orais a nível mundial, afetando praticamente todas as idades e populações geográficas (World Health Organization, 2012;Zarco et al., 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a taxa de prevalência para a doença periodontal severa que pode resultar na perda de dentes é de 15 a 20% para adultos de idade entre os 35 e os 44 anos. A completa perda de dentes naturais é muito difundida a nível mundial, afetando particularmente a terceira idade. A nível global cerca de 30% da população entre as idades 65 e 74 anos já não possui dentes naturais. A periodontite agressiva afeta pessoas durante a puberdade o que leva a uma perda prematura de dentes, que afeta cerca de 2% dos jovens (World Health Organization, 2012).

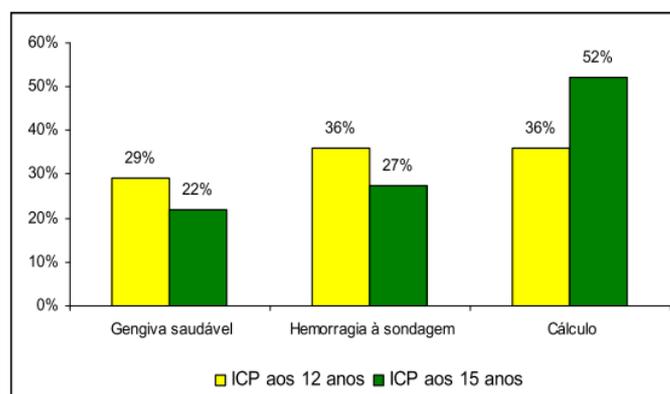


Figura 16 – Índice Comunitário Periodontal de jovens Portugueses de 12 e 15 anos. Retirada e adaptada de: “Estudo Nacional de Prevalência das Doenças Orais” (von Amann e Cádima, 2008)

Em Portugal, pelo programa nacional de saúde oral foi efetuado em 2008 um estudo nacional de atualização da prevalência das doenças orais (von Amann e Cádima, 2008). O referente às doenças periodontais foi avaliado através do Índice Comunitário Periodontal, que mede a prevalência da doença e o número médio de sextantes afetados por hemorragia gengival e/ou cálculo. Os resultados obtidos para os 12 e os 15 anos, foram de aproximadamente 70% a 80% dos jovens que se encontravam afetados por doenças periodontais, com uma prevalência crescente com o aumento da idade, e aumentando também a percentagem de adolescentes com cálculo (Figura 16).

A Índia que representa cerca de 17,31% da população mundial, o que corresponde a uma em cada seis pessoas vive na Índia, segundo um estudo recente (2016) de revisão sobre a prevalência da doença periodontal neste país, 95% da população sofre de doença periodontal. (Chandra, Yadav, Narula e Dutta, 2016).

A gengivite tem uma prevalência superior a 90% nos adultos, pelo que se pensa que possivelmente seja a doença mais comum de origem bacteriana (Wade, 2013). A GUNA é uma doença infecciosa aguda, rara e mais severa que a gengivite comum que afeta 0,5 a 11% da população, e é caracterizada pela ulceração e inflamação interdentária do tecido gengival (Mizrahi, 2014).

A 15 de Março de 2015 foi efetuada pela Organização Mundial de Saúde uma atualização do índice comunitário periodontal nas faixas etárias: 15 a 19 anos, 35 a 44 anos e 65 a 74 anos (World Health Organization, 2015). Os códigos usados foram:

- Código 0: condição de saúde periodontal;
- Código 1: hemorragia gengival;
- Código 2: placa e hemorragia;
- Código 3: bolsas periodontais ligeiras (4 a 5mm);
- Código 4: bolsas periodontais profundas (6mm ou mais).

Das faixas etárias escolhidas a que revelou códigos superiores foi entre os 35 e os 44 anos de idade, pelo que de acordo com as regiões mundiais denominadas pela Organização Mundial de Saúde, obtiveram-se os resultados estatísticos apresentados na Figura 17. Conclui-se que os estados mais prevalentes são a placa e hemorragia (código 2) e bolsas periodontais ligeiras (código 3).

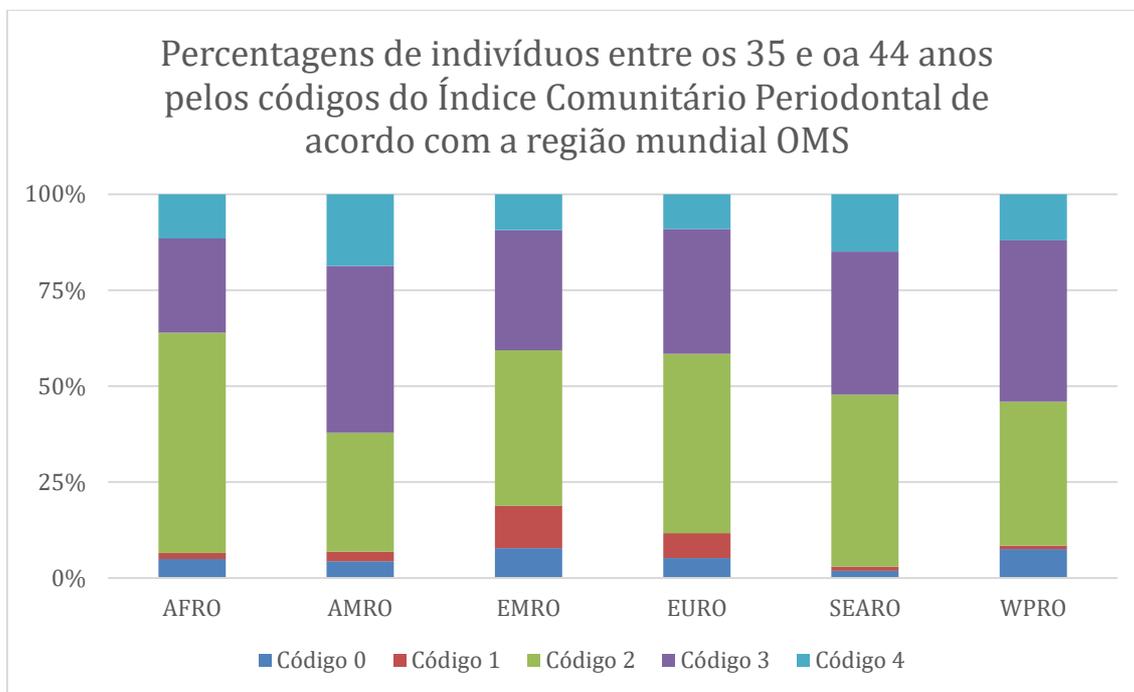


Figura 17 – Estado periodontal de indivíduos entre os 35 e os 44 anos por região mundial. Retirada e adaptada de: "WHO Global Oral Health Data Bank and WHO Oral Health Country/Area Profile Programme, 2000" - Dr.Poul Erik Petersen, World Health Organization.

## 1.6. A resposta inflamatória como mediadora da doença periodontal

A saliva é um fluido corporal composto por uma mistura de mucinas, lípidos, proteínas e outras moléculas bioativas que revestem a cavidade oral, com propriedade escoantes que têm como função proteger a cavidade oral, através da lubrificação das superfícies, o que permite a sensação e perceção de textura (Vijay, Inui, Dodds, Proctor e Carpenter, 2015)(Tabela 3). Este fluido em conjunto com os movimentos mandibulares é um mecanismo importante na prevenção da adesão bacteriana às superfícies dentárias e mucosas orais (Newman et al., 2015). No entanto as superfícies revestidas por saliva não conseguem prevenir contra todas as espécies bacterianas, como é o caso da *Porphyromonas gingivalis* que se consegue aderir à película salivar através da fimbria.

Tabela 3 – Constituintes salivares que contribuem para a imunidade inata. Retirada e adaptada de: “Caranza’s Clinical Periodontology” (Newman et al., 2015)

<u>Constituintes Salivares</u>	<u>Funções Defensivas</u>
<b>Anticorpos (exemplo: IgA)</b>	Inibição da adesão bacteriana Promove aglutinação
<b>Estatinas</b>	Neutraliza lipopolissacáridos Inibe destruição de enzimas
<b>Cistatinas</b>	Inibe o crescimento bacteriano
<b>Lactoferrinas</b>	Inibe o crescimento bacteriano
<b>Lisozimas</b>	Lise das membranas celulares bacterianas
<b>Mucinas</b>	Inibe a adesão bacteriana, Promove aglutinação
<b>Peroxidase</b>	Neutraliza o peróxido de hidrogénio bacteriano

A hipótese do elemento chave da patogenicidade infere que patogénicos específicos têm influência na doença periodontal ao alterarem significativamente a composição da microflora saudável (Krishnan et al., 2016). Sendo a periodontite uma doença complexa, surgiram várias hipóteses para a sua etiologia. A compreensão mais profunda do microbioma dá ênfase à ideia de que as interações desta comunidade microbiológica pode modular a expressão de mediadores imunológicos inatos. Por sua vez, a disrupção da expressão dos mediadores inflamatórios contribui fortemente para a destruição do tecido e osso de suporte das estruturas dentárias (Darveau, 2010).



Figura 18 – Sulco, espaço biológico periodontal e constituição do espaço biológico. Retirada e adaptada de: <http://image.slidesharecdn.com/manutenoeimplantodontia-140916222236-phpapp01/95/manutenoeimplantodontia-4-638.jpg?cb=1410906365>

O epitélio gengival, mais especificamente o epitélio juncional é um epitélio especializado localizado na interface entre o sulco gengival e os tecidos moles e duros

periodontais que efetua a ligação da superfície dentária ao tecido envolvente, e é altamente poroso (Newman et al., 2015) (Figura 18). As células do epitélio juncional estão interconectadas por alguns desmossomas, resultando em vários espaços intracelulares preenchidos por fluidos que acompanham a constante estimulação microbiana pela expressão de mediadores do sistema imune inato para o periodonto. A expressão da seletina-E, de moléculas de adesão intercelular (ICAMs) e de interleucina-8 (IL-8) facilita a transição dos neutrófilos da zona mais vascularizada do tecido periodontal para o sulco gengival, onde formam uma barreira entre o tecido hospedeiro e o biofilme dento-plaquetário. Normalmente, a presença de neutrófilos num tecido do indivíduo é um sinal de infecção bacteriana, no entanto é importante denotar que os neutrófilos transitam no tecido periodontal sem estabelecer residência (Darveau, 2010). O periodonto expressa também outros numerosos mediadores inatos, como a  $\beta$ -defensina humana 1 (BD1), BD2 e BD3, e ainda CD14 (sob a forma solúvel ou ligada à membrana) e a proteína ligante lipopolissacarídeo (LBP). A presença destas últimas em altas concentrações está associada maioritariamente ao estado de saúde periodontal.

O microbioma periodontal em saúde e em doença apresenta uma composição dramaticamente diferente (Hajishengallis, Darveau e Curtis, 2012)(Tabela 4). Esta transição no microbioma periodontal pode ser interpretada como sinal de que bactérias específicas estão envolvidas na etiologia da periodontite, bactérias estas que não são detetáveis no estado de saúde ou se encontram em quantidade muito baixas, ou ainda que a doença é devido a um estado disbiótico do microbioma periodontal, que leva a alterações microrganismos-hospedeiro de magnitude suficiente para despoletar a doença inflamatória. As bactérias consideradas periodontopatogénicas específicas são maioritariamente gram-negativos anaeróbios, agrupadas em seis complexos em que o vermelho corresponde ao de maior patogenicidade. Deste complexo vermelho, existem três espécies que se encontram frequentemente isoladas e que estão fortemente associadas a localizações afetadas por doença: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. A *Porphyromonas gingivalis* é considerada como possível agente prejudicial ao sistema imune inato ao alterar o crescimento e desenvolvimento do biofilme, desencadeando uma alteração destrutiva no estado homeostático normal do hospedeiro com a microbiota do periodonto. Por estas razões, a *Porphyromonas gingivalis* pode ser o agente patogénico chave para a promoção do microbioma periodontal doente.

Tabela 4 - Bactérias tipicamente prevalentes na composição de cada estado periodontal. Retirada e adaptada de: artigo “Review Article Trends in Laboratory Diagnostic Methods” (Bolerázska, Mareková e Markovská, 2016)

Periodonto Saudável	Gengivite	Periodontite Crônica	Periodontite Agressiva
<p><b>Gram-positivos</b>  <i>Streptococcus oralis</i>,  <i>Streptococcus mitis</i>,  <i>Streptococcus gordonii</i>,  <i>Streptococcus sanguinis</i>,  <i>Actinomyces gerencseriae</i>,  <i>Actinomyces naeslundii</i></p>	<p><b>Gram-positivos</b>  <i>Lactobacillus spp.</i>,  <i>Actinomyces naeslundii</i>,  <i>Peptostreptococcus micros</i>,  <i>Streptococcus onginosus</i>,  <i>Fusobacterium nucleatum</i></p>	<p><b>Gram-positivos</b>  <i>Eubacterium bcrachy</i>,  <i>Eubacterium nodatum</i>,  <i>Peptostreptococcus stomatis</i></p>	
<p><b>Gram-negativos</b>  <i>Fusobacterium spp.</i>,  <i>Prevotella nigrescens</i>,  <i>Veillonella spp.</i></p>	<p><b>Gram-negativos</b>  <i>Prevotella intermedia</i>,  <i>Fusobacterium nucleatum</i>,  <i>Campylobacter spp.</i>,  <i>Haemophilus spp.</i>,  <i>Selenomonas spp.</i>,  <i>Treponema spp.</i></p>	<p><b>Gram-negativos</b>  <i>Porphyromonas gingivalis</i>,  <i>Tannerella forsythia</i>,  <i>Treponema denticola</i>,  <i>Campylobacter rectus</i>,  <i>Prevotella intermedia</i>,  <i>Fusobacterium nucleatum</i></p>	<p><b>Gram-negativos</b>  <i>Actinobacillus actinomycesetemcomitans</i>,  <i>Porphyromonas gingivalis</i>,  <i>Tannerella forsythia</i>,  <i>Prevotella intermedia</i>,  <i>Prevotella nigrescens</i>,  <i>Fusobacterium nucleatum</i>,  <i>Campylobacter rectus</i></p>

Os processos desencadeados pelo biofilme subgengival são os responsáveis pelas doenças periodontais. Abaixo da linha gengival, o fluido gengival circunda a superfície radicular do dente formando um fluido que é na sua composição mais semelhante ao soro do que à saliva. O microambiente subgengival difere em muito do supragengival, o que leva também a uma distinta microflora. As bactérias anaeróbicas subgengivais expostas ao fluido gengival ocupam um nicho que é caracterizado pelo catabolismo de aminoácidos de proteínas exógenas, através da secreção de proteases, em que a diversidade bacteriana é superior à do biofilme supragengival. Algumas destas bactérias são consideradas periodontopatogénios (como é o caso da *Porphyromonas gingivalis*) e a causa da periodontite (Kolenbrander et al., 2010). No fluido gengival encontram-se em localizações saudáveis as citocinas que normalmente se encontram associadas à inflamação, como é o caso das citocinas possivelmente prejudiciais IL-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral (TNF) e a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), mas em quantidades menores. Assim, em conjunto com a expressão de componentes de defesa inatos, o periodonto continuamente expressa citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão celular que estão envolvidas na manutenção da homeostase tecidual (Darveau, 2010).

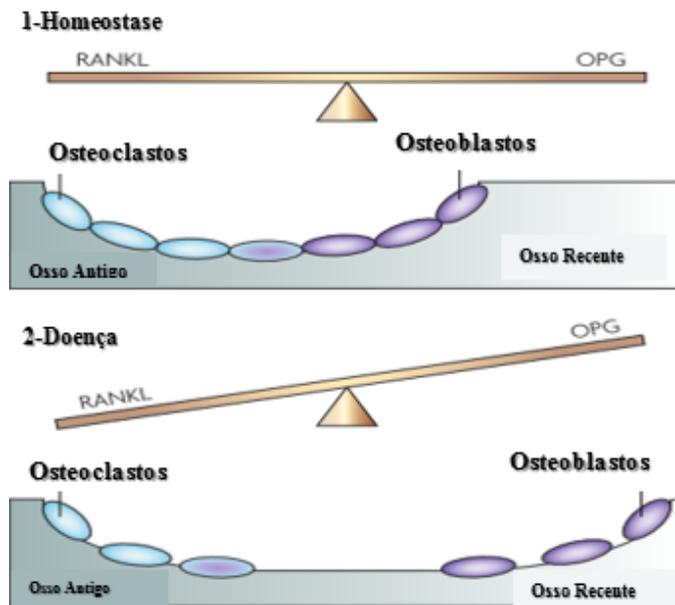


Figura 19 - Imagem correspondente ao rácio RANKL/OPG. No caso 1-Homeostase as concentrações estão equilibradas, enquanto no caso 2-Doença a concentração de RANKL está aumentada em relação à OPG. Retirada e adaptada de: artigo “*Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis*” de Darveau (2010).

A resposta imune do hospedeiro pode contribuir para a periodontite. Os mecanismos principais que regulam a normal atividade de reabsorção e deposição óssea ocorrem durante o processo de remodelação óssea, estão diretamente relacionadas com o rácio de RANKL (recetor ativador do ligante ao fator nuclear  $\kappa$ B, também denominado TNFSF11) e com a OPG (osteoprotegrina, também denominada TNFRSF11B), este mecanismo provavelmente também contribui para a perda óssea observada na periodontite (Figura 19) (Newman et al., 2015). A RANKL está presente em vários tipos celulares e liga-se à RANK (também denominada TNFSF11A) nos precursores osteoclásticos, levando à sua diferenciação em células macrofágicas ativas que secretam enzimas que degradam o osso. A OPG é um recetor solúvel da RANKL que previne a ligação e interação RANK-RANKL. Quando a OPG se encontra em altas concentrações, a RANKL não se liga aos precursores osteoclásticos e a perda óssea é evitada. Os níveis de OPG são regulados pela transformação do fator de crescimento  $\beta$  em proteínas morfogénicas ósseas, enquanto a síntese de RANKL é induzida por citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  e TNF. Assim sendo, o aumento dos níveis de concentração de citocinas pró-in-

flamatórias no tecido periodontal saudável pode diretamente afetar a perda óssea ao aumentar o rácio RANKL/OPG.

A descoberta que membros da família TLR (recetores do tipo Toll) de recetores de reconhecimento microbiano estão presentes no periodonto gera a possibilidade de que várias espécies bacterianas, incluindo as comensais, possuam a capacidade de alterar o tecido em homeostase (Darveau, 2010). Estes recetores reconhecem componentes microbianos (como ADN, flagelo e fibrina) que são partilhados pela comensal oral e espécies periodontopatogénicas, e conhecem peptidoglicanos e ácido lipoteicóico em bactérias gram-positivas tais como LPS em bactérias gram-negativas, e assim podem ativar variadas respostas inatas do hospedeiro. Uma vez que a composição da placa dentária se altera, as várias bactérias da placa subgingival podem contribuir para a resposta inflamatória destrutiva. A placa dentária contém vários microrganismos capazes de ativar a TLR2 e a TLR4. Não existe uma forte associação entre espécies bacterianas específicas da placa dentária com a capacidade de ativar a TLR2 ou TLR4, no entanto em ratos a TLR2 medeia a perda óssea em resposta à *Porphyromonas gingivalis*. Esta informação suporta a teoria de que a TLR2, o recetor hospedeiro ao interagir com as bactérias orais consegue iniciar uma resposta inflamatória destrutiva no periodonto.

Tabela 5 – Fatores de Virulência da *Porphyromonas gingivalis* que atuam no Sistema Imune. Retirada e adaptada de: “*Carranza’s Clinical Periodontology*” (Newman et al., 2015)

<u>Fatores de Virulência</u>	<u>Efeitos no Sistema Imune</u>
<b>Proteases (gingipains)</b>	Degradação das moléculas de sinalização (CD14) e citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6)
<b>Capacidade de invasão celular</b>	Inibição da secreção de IL-8
<b>LPS (lipopolissacáridos)</b>	Antagonismo dos efeitos estimuladores dos LPS de outras espécies;  Não ocorre regulação positiva da E-seletina
<b>Fímbrias</b>	Inibição da secreção de IL-12 pelos macrófagos
<b>Polissacáridos da superfície celular</b>	Resistência ao complemento
<b>Ácidos Gordos Leves</b>	Indução da apoptose nas células do hospedeiro

O complexo vermelho é considerado o com maior patogenicidade, incluindo os periodontopatogénicos *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella. forsythia* e *Treponema*

*denticola*, que estão fortemente associados entre si e com zonas relacionadas com a presença de doença, conseguem inibir as funções de defesa inata como a inibição da IL-8 e a regulação do sinal de TLR4 pela produção do lípido A, que é uma endotoxina bacteriana responsável pela resposta imunitária (Darveau, 2010). No que respeita à inibição da IL-8, a *Porphyromonas gingivalis* é o periodontopatogénio melhor caracterizado, na sua capacidade de inibir as funções de defesa hospedeira (Tabela 5) (Newman et al., 2015). Este fenómeno de nome “*local chemokine paralysis*” é proposto como um mecanismo de virulência na medida em que ao prejudicar o gradiente de IL-8 em tecidos saudáveis, promove a transição de neutrófilos dos tecidos vasculares periodontais para o sulco gengival, o que aumenta o fluxo do fluido gengival para a bolsa. A migração dos neutrófilos promove a destruição do epitélio juncional pela via de degradação da membrana basal através da libertação de proteases e pela ação das espécies reativas de oxigénio. As bactérias comensais são presumidas como contribuidoras para este gradiente, visto que a concentração de IL-8 está aumentada nas zonas mais próximas de placa dentária e as células epiteliais gengivais secretam IL-8 como resposta a diversas espécies de bactérias orais.

No caso da *Porphyromonas gingivalis*, vários estudos mostram que a fosfoserina fosfatase SerB contribui para a inibição da IL-8 (Figura 20). A síntese da SerB é induzida no contacto com as células epiteliais gengivais e podem modificar a normal funcionalidade das células do hospedeiro, criando um ambiente intracelular favorável à bactéria (Zenobia e Hajishengallis, 2015). A fosfoserina fosfatase pensa-se que esteja associada a um atraso no recrutamento de neutrófilos, e na ausência relativa destas defesas na cavidade oral é favorecida a formação inicial do biofilme. As bactérias que constituem o complexo vermelho também conseguem inibir a resposta defensiva inata do hospedeiro através da produção do lípido A, que age como antagonista do TLR4 (Darveau, 2010). O lípido A, que é parte do LPS da membrana externa das bactérias gram-negativas, tem composição heterogénea na *Porphyromonas gingivalis*. Pode ser constituído por estruturas 5-acil monofosfato, que são agonistas fracos do TLR4, e pela 4-acil monofostato que é uma estrutura antagonista do TLR4. A expressão de ambas as estruturas agonista e antagonista é regulada pela concentração de hemina. O lípido A antagonista da TLR4 diminui a expressão de  $\beta$ -defensina num sistema epitelial humano reconstruído e interrompe o fator de crescimento epidérmico (EGF) – dependente das vias de sinalização,

como a cascata de sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) – relacionada com a remodelação da matriz tecidual periodontal (Zenobia e Hajishengallis, 2015). A estrutura do lípido A agonista da TLR4 da *Porphyromonas gingivalis* inibe a EGF ao mediar a sinalização a nível extracelular da MAPK3, MAPK1, p38 MAPKs e proteínas CREB, que são componentes da cascata de sinalização da MAPK. Deste modo, independentemente da resposta inata do hospedeiro, a *Porphyromonas gingivalis* consegue perturbar a homeostase pelas vias de sinalização celulares que são partilhadas pela resposta inata do hospedeiro e pelas vias de remodelação dos tecidos.

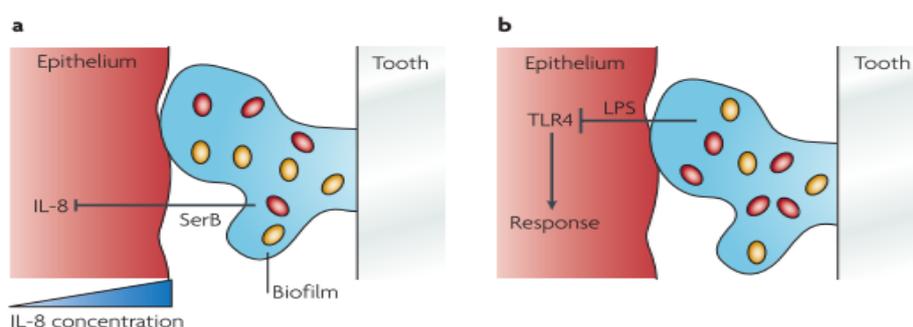


Figura 20 - *Porphyromonas gingivalis*, membro do complexo vermelho bacteriano, inibe as funções de defesa inatas do hospedeiro no epitélio gengival. a) SerB, uma fosfoesterase, inibe a interleucina-8 (IL-8) e conseqüentemente pode perturbar outros processos homeostáticos celulares epiteliais. b) Estruturas específicas do lípido A nos lipopolissacarídeos da *Porphyromonas gingivalis* inibe a respostas dos receptores 4 do tipo Toll para outras bactérias. Retirada e adaptada de: artigo “*Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis*” de Darveau (2010).

Estudos imuno-histoquímicos revelaram que a resposta inflamatória gengival local é caracterizada pelo recrutamento abundante de leucócitos polimorfonucleares (PMNL), linfócitos B e anticorpos produzindo células plasmáticas nos tecidos periodontais (Cifcibasi et al., 2015). Comparando amostras de sangue periférico de tecidos gengivais de pacientes periodontalmente saudáveis com doentes periodontais, neste último os níveis de rácio encontrados de T helper/T supressor estão diminuídos (Tabela 6). Um estudo efetuado recentemente mostrou que há um aumento significativo na contagem de linfócitos T citotóxicos ativados tanto na periodontite agressiva generalizada como na periodontite crónica, quando comparadas com saúde periodontal (Cifcibasi et al., 2015). Em resposta à infeção, os componentes do sistema imunitário agem como primeira linha de defesa através de uma resposta imune adaptativa, que inclui a humoral (mediada por

linfócitos B) e celular (mediada por linfócitos T), com o intuito de controlar a infecção e progressão da doença. O nível de linfócitos T citotóxicos ativados (Tc) é controlado por linfócitos T reguladores (Treg) após terminado o objetivo das células Tc. A ativação descontrolada dos linfócitos Tc promove a danificação dos tecidos. Quando as interações bactéria-hospedeiro causam a destruição do tecido na doença periodontal, pensa-se que a ativação das Tc tenha um papel na progressão da doença. Ainda assim, os mecanismos que desencadeiam este fenómeno, não são ainda completamente compreendidos.

Tabela 6 - Proporções de linfócitos T das amostras de sangue em pacientes com periodontite agressiva generalizada, periodontite crónica e saúde periodontal. Retirada e adaptada de: artigo “*The role of activated cytotoxic T cells in etiopathogenesis of periodontal disease: does it harm or does it heal?*” (Cifcibasi et al., 2015)

	Periodontite Agressiva Generalizada	Periodontite Crónica	Saúde Periodontal
CD3	66.08 ± 6.02	64.55 ± 8.28	58.8 ± 7.53
CD4	36.62 ± 7.05	36.73 ± 8.97	32.4 ± 6.58
CD19	11.23 ± 4.96	9.09 ± 4.82	7.2 ± 6.18
CD8 <sup>+</sup> /CD28 <sup>+</sup>	12.77 ± 3.65	14.25 ± 5.65	7.8 ± 2.38

## 1.7. Fatores de risco para a doença periodontal

A doença periodontal tem vários fatores de risco. Entenda-se por fatores de risco tanto aspetos comportamentais pessoais ou estilo de vida, como exposição ambiental, de nascença ou característica adquirida, que com base na evidência epidemiológica revela estar associado com uma condição relacionada com a saúde (Kulkarni e Kinane, 2014). A presença de fatores de risco implica diretamente o aumento da probabilidade de desenvolver a doença. Os principais fatores envolvidos que são capazes de iniciar a uma mudança ecológica para o desenvolvimento da doença são o tabaco, uma pobre higiene oral, um sistema imune comprometido e genética (Zarco et al., 2012).

### 1.7.1. Tabaco

O tabaco contém mais de 4000 substâncias tóxicas reportadas, como o monóxido de carbono, radicais oxidantes, agentes cancerígenos (como é o caso das nitrosaminas) e nicotina (substância aditiva psicoativa) (Shivanaikar, Faizuddin e Bhat, 2016). Destas substâncias, a maior parte dos efeitos tóxicos são atribuídos à nicotina, componente major dos cigarros (Tanaka et al., 2013). O consumo de tabaco tem uma relação direta sobre o mecanismo homeostático periodontal bem como influencia a microflora periodontal: (1) altera a vascularização dos tecidos; (2) altera a função e adesão dos fibroblastos; (3) suprime a proliferação dos osteoblastos; (4) estimula os osteoclastos; (5) altera a função dos PMNL (leucócitos polimorfonucleares) prejudicando a fagocitose, e formação de superóxido e peróxido de hidrogénio e expressão de integrinas; e (6) inibe a produção de proteases (Zia et al., 2015).

No periodonto o tabagismo induz a vasoconstrição, que contribui para a diminuição do fluxo sanguíneo gengival e diminui a quantidade de oxigénio disponível e constituintes sanguíneos que atingem a gengiva. A nicotina e cotinina (metabolito originado da conversão da nicotina pelo hospedeiro) incorporam-se nas superfícies radiculares e nos fibroblastos o que impede a restituição da adesão dos fibroblastos à superfície radicular (Meenawat et al., 2015). Esta cadeia de ação torna o ambiente periodontal propício a agentes patogénicos específicos incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, o que sugere o aumento do risco para o desenvolvimento e progressão da doença periodontal (Genco e Borgnakke, 2013). Estas bactérias pertencentes ao complexo vermelho vão, como referido anteriormente, inibir a IL-8 e através do lípido A mediar a regulação da TLR4.

A interleucina-1 (IL-1) está comprovada como sendo a chave da regulação da homeostase tecidual, inflamação, imunidade e colapso dos tecidos. Estimula os fibroblastos gengivais a produzir colagenase e PGE<sub>2</sub>, que é um vasodilatador e mediador da destruição óssea. Em associação com o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) atuam nas células endoteliais e aumentam a ligação dos neutrófilos e monócitos, assim auxiliam o recrutamento destas células para locais de inflamação. Todos os mecanismos dependentes da IL-1 $\beta$  contribuem para a inflamação, destruição dos tecidos periodontais e

perda de inserção dentária, que são características da doença periodontal. Os queratinócitos são vastamente expostos ao fumo do tabaco e aos seus componentes, respondendo a esta exposição com a produção de citocinas inflamatórias como a PGE<sub>2</sub> e IL-1. Desta forma, o consumo de tabaco promove o rápido aumento dos níveis de bactérias anaeróbias, da estimulação dos monócitos e macrófagos gengivais e consequente aumento dos níveis de expressão de IL-1 $\beta$ . Este mecanismo comprova que fumar tabaco é um fator de risco importante para o desenvolvimento e progressão da periodontite (Meenawat et al., 2015).

O termo apoptose é usado para descrever um estado morfológicamente distinto de morte celular, conhecido como morte celular programada. O modo apoptótico da morte celular é um processo ativo e definido que tem grande importância no desenvolvimento de organismos multicelulares e na regulação e manutenção dos aglomerados celulares, nos tecidos em condições fisiológicas e patológicas. Este processo pode ser modulado por vários estímulos, nomeadamente hormonas, citocinas, fatores de crescimento, infeções bacterianas ou virais, e por respostas imunitárias (Shivanaikar et al., 2016).

Entre outros fatores, o produto de dois genes codificantes para as proteínas Bcl-2 e p53 mostraram um papel fundamental na regulação da apoptose. A Bcl-2 é membro da família de proteínas anti-apoptóticas capazes de prevenir ou reduzir a morte celular induzida por vários estímulos (Shivanaikar et al., 2016). A proteína p53 é o produto de um gene supressor tumoral, que ao ser expressa é capaz de induzir a apoptose. Esta proteína está implicada na regulação dinâmica dos tecidos, especificamente, através da indução da apoptose em células terminais diferenciadas, incluindo células inflamatórias. Os neutrófilos são as células imunitárias mais abundantes no infiltrado inflamatório gengival de pacientes que sofrem de doença periodontal.

Os neutrófilos circulantes têm uma semivida curta e o início do processo de apoptose está associado a diversas funções como a adesão e a fagocitose, que eventualmente levam à eliminação destas células do local da lesão por fagocitose, assim promovendo a resolução da inflamação (Shivanaikar et al., 2016). A tendência para sofrer apoptose na lesão periodontal previne os neutrófilos de permanecerem por longos períodos de tempo em locais de infeção e limita o potencial de pró-inflamação, e conse-

quentemente limita os danos nos tecidos. A nicotina ao inibir a produção de superóxido e peróxido de hidrogénio pelos neutrófilos estimulados, prejudica a capacidade do hospedeiro em combater a infecção periodontal, por inibir a apoptose dos neutrófilos, que tem como consequência a sua permanência por um período de tempo mais prolongado, o aumento dos níveis de citocinas e finalmente o colapso do tecidos; e ainda inibe a apoptose induzida pelo fator de necrose tumoral, o que leva ao aumento da expressão de Bcl-2.

### **1.7.2. Diabetes Mellitus**

A diabetes é uma desordem metabólica crónica que perturba a homeostase da glucose. É classificada em dois tipos: diabetes mellitus tipo I (DM1) e diabetes mellitus tipo II (DM2). A DM1 manifesta-se pela falha das células  $\beta$  pancreáticas na produção suficiente de insulina e é uma condição autoimune. A DM2 manifesta-se pela resistência oferecida pelos tecidos periféricos à ação da insulina, independentemente da produção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas, em que na fase inicial desta condição, a secreção de insulina encontra-se aumentada (Gurav, 2016).

A periodontite crónica coexiste frequentemente com a diabetes mal controlada, o que faz com que a diabetes seja considerada um fator de risco para a periodontite. Vários estudos conduzidos em adultos reportaram uma significativa associação bidirecional entre a diabetes (tipo I e tipo II) com a doença periodontal, ou seja, a diabetes aumenta o risco para o desenvolvimento da periodontite e agrava a periodontite pré-existente, e a periodontite pode aumentar o risco para a diabetes (Kalsi, Chopra, & Sood, 2015) (Figura 21).

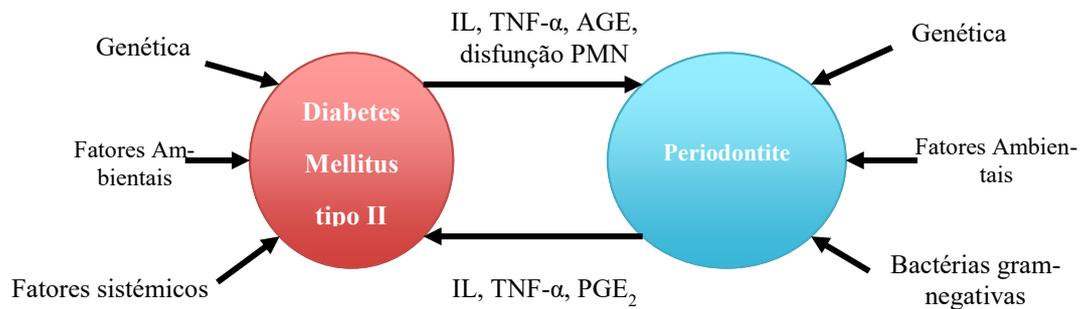


Figura 21 - Relação bidirecional entre a Diabetes Mellitus tipo II e a periodontite. Legenda: IL - interleucina; TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral- $\alpha$ ; PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E2, AGE – produtos avançados de glicação; PMN – neutrófilos polimorfonucleares. Retirada e adaptada de: artigo “*Management of diabolical diabetes mellitus and periodontitis nexus: are we doing enough?*” (Gurav, 2016)

A infecção periodontal aumenta a inflamação sistémica, o que pode induzir um estado crónico de resistência à insulina e assim contribuir para o ciclo de hiperglicemia. Este fenómeno amplifica a via clássica de degradação, destruição e proliferação do tecido juncional, na presença de diabetes. Está provado que o tratamento da periodontite em pacientes diabéticos, tem um efeito benéfico no controlo da glucose sanguínea. Por outro lado, a diabetes mal controlada é um importante fator de risco para a periodontite e gengivite (Kalsi et al., 2015). A diabetes mellitus é exacerbada por citocinas pró-inflamatórias expressas pela gengiva em pacientes com periodontite ao entrarem na circulação sistémica, e reciprocamente as citocinas pró-inflamatórias em pacientes diabéticos podem agravar a doença periodontal existente. A inflamação sistémica crónica subclínica pode então contribuir para o aumento da resistência à insulina – condição pré-clínica da manifestação da DM2 (Islam, Seo, Lee, & Moon, 2015; Suzuki et al., 2015).

Os mecanismos induzidos pela diabetes mellitus que prejudicam o estado periodontal podem ser categorizados em: (1) produtos finais da glicação avançada (AGEs) mediados pelos tecidos afetados; e (2) disfunção das células imunes (Gurav, 2016).

A hiperglicemia crónica promove a formação de AGEs, como resultado da ligação não enzimática entre as porções de açúcares reduzidos com resíduos livres de amina provindos de proteínas em modelos animais (Gurav, 2016). Os AGEs exercem os seus efeitos destrutivos ao estabelecer ligação com um recetor específico, conhecido como

recetor de AGE (RAGE). A acoplação AGE-RAGE em modelos murinos em que se induziu a doença periodontal em conjunto com a diabetes mellitus, revelou uma resposta inflamatória contínua e uma perda óssea progressiva quando comparados com os modelos sem diabetes mellitus. As células imunitárias como os monócitos, os macrófagos e os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) possuem o recetor RAGE. O AGE faz com que estas células produzam superóxido em excesso, dando origem à destruição dos tecidos. A resposta inflamatória prolongada e contínua também realça o processo de apoptose, que por consequência nos tecidos periodontais induz o processo de destruição da periodontite. Os AGEs em combinação com citocinas pró-inflamatórias promovem a apoptose dos fibroblastos, o que se torna prejudicial para a cicatrização periodontal. Estes produtos finais da glicação avançada têm ainda influência negativa sobre a diferenciação, crescimento e funcionalidade das células osteoblásticas (Gurav, 2016).

A periodontite contribui para alterações ao meio interno humano pela entrada de bactérias ou pelos metabolitos bacterianos, como os lipopolissacáridos, na circulação geral, além disso também origina efeitos sistémicos por mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e a IL-6, produzidos localmente em resposta à infeção periodontal (Islam et al., 2015). Com base neste fenómeno, sugere-se que é possível que estes mediadores podem aumentar a inflamação de baixo grau e a resistência à insulina. Da mesma forma, a hiperlipidémia também está associada a uma resistência à insulina, por parte dos mediadores pró-inflamatórios. Em pacientes com periodontite, observou-se que os níveis de glicémia em jejum se encontram mais elevados quando comparados com os pacientes sem periodontite, e em pacientes com periodontite severa com diabetes os níveis de glicémia em jejum são também muito superiores, quando comparados com pacientes com periodontite severa sem diabetes. Foi ainda observado que em pacientes não diabéticos com periodontite a função das células  $\beta$  está diminuída o que pode levar a uma glicémia em jejum, que é prejudicial à saúde e consequentemente promover a diabetes (Islam et al., 2015).

Um caso clínico efetuado pelos autores Seshima, Nishina, Namba e Saito (2016), em que se efetuou terapia regenerativa periodontal num paciente com DM2 e com periodontite crónica. O plano de tratamento incluiu:

1. Terapia periodontal inicial: instrução e manutenção da higiene oral, alisamento radicular e destartarização, extração do terceiro molar incluso (38) e ajuste oclusal dos dentes 27 e 37.
2. Reavaliação.
3. Cirurgia periodontal para localizações dentárias com bolsas periodontais superiores a 4mm.
4. Terapia periodontal de suporte ou manutenção.

A diabetes tem um efeito adverso na saúde periodontal, tal como a doença periodontal afeta o controlo glicémico e as complicações associadas à diabetes (Seshima et al., 2016). Este caso comprovou a teoria de que o tratamento da periodontite ajuda no controlo glicémico logo após a terapia periodontal inicial. O que é concordante com estudos efetuados por outros autores. Uma revisão de meta-análise por parte Engebretson e Kocher (2013), concluiu de igual forma que a terapia periodontal tem efeitos positivos no controlo da glicémia através da hemoglobina glicosilada A1c (HbA1c) que reflete os níveis de glicose no soro.

O tratamento da periodontite promove a redução nos níveis séricos de TNF- $\alpha$  juntamente com a redução dos valores de HbA1c em pacientes com periodontite e diabetes (Islam et al., 2015). A redução destes dois fatores indica que a remissão da inflamação periodontal contribui para a redução dos níveis de mediadores inflamatórios serológicos associados à resistência insulínica, com a subsequente melhoria do controlo glicémico. Há ainda evidência de que o controlo da infeção periodontal em pessoas diabéticas reduz os níveis de produtos finais da glicação avançada, e desta forma induz a diminuição da hiperglicemia (Islam et al., 2015).

### **1.7.3. Depressão**

O estado depressivo é considerado um importante fator de risco no desenvolvimento, severidade e progressão da periodontite. Estudos neuroendocrinológicos levantam a hipótese de que há um distúrbio no sistema axial hipotálamo-hipófise e no sistema hipotálamo-hipófise-tiróide. A ansiedade aumenta os níveis da hormona adrenocortico-

trópica (ACTH) e do cortisol no sangue, o que tem um efeito negativo sobre o mecanismo imune periodontal. Os efeitos negativos do cortisol nos mecanismos de defesa imunitários poderão ter uma influência negativa na iniciação e progressão da periodontite (Sundararajan, Muthukumar e Rao, 2015).

Estudos em pacientes com periodontite, efetuados por Katuri et al. (2016), demonstram que o cortisol em excesso contribui para a hiperglicemia, para redução de formação óssea, para a absorção de cálcio pelo intestino e baixa regulação da síntese de colagénio. Este glucocorticóide reduz a contagem de linfócitos, monócitos e outras células pró-inflamatórias circulantes o que coopera com a diminuição das suas funções, como a quimiotaxia e proliferação do responsável pela diferenciação dos linfócitos em linfócitos T helper, linfócitos T citotóxicos, células natural killer, anticorpos IgG e IgA (imunoglobulinas G e A) formando células B. A decrescente funcionalidade dos neutrófilos e diminuta secreção dos anticorpos IgA e IgG, aumenta a suscetibilidade para infecções periodontais e subsequente aumento da produção de citocinas inflamatórias como a IL-1 e metaloproteases da matriz (MMP) pelos periodontopatogénios, o que leva à rápida destruição do tecido periodontal (Katuri et al., 2016).

#### **1.7.4. Genética do hospedeiro**

A grande maioria das investigações genéticas relacionadas com a cavidade oral focam-se nos polimorfismos genéticos que desempenham de alguma forma um papel na resposta imune, no processo destrutivo dos tecidos ou nos mecanismos metabólicos. Em alguns casos, os polimorfismos genéticos podem alterar uma proteína ou a sua expressão, possivelmente levando a alterações na imunidade inata e adaptativa, o que pode ser determinante para a progressão de certas doenças (Barnea et al., 2015).

A doença periodontal considera-se como uma doença complexa associada a múltiplos fatores genéticos e ambientais. Estudos genéticos revelaram a natureza poligénica da periodontite. Os polimorfismos genéticos nos genes de citocinas são um fator promissor para a indução da doença periodontal, ao amplificar o processo inflamatório e

permitir uma maior suscetibilidade para o agravamento da periodontite (Barnea et al., 2015).

Os polimorfismos nucleótidos únicos (SNPs) são variações na sequência do ácido desoxirribonucleico (ADN) que resultam da alteração de apenas um nucleótido (Figura 22), e alguns destes SNPs são específicos para uma população. Os polimorfismos encontrados não resultam na substituição do aminoácido mas podem alterar a função do gene e/ou a expressão do mesmo. Ao sofrer estas alterações os polimorfismos genéticos podem atuar tanto como fatores de proteção como de destruição para algumas doenças (Karthikeyan et al., 2014).

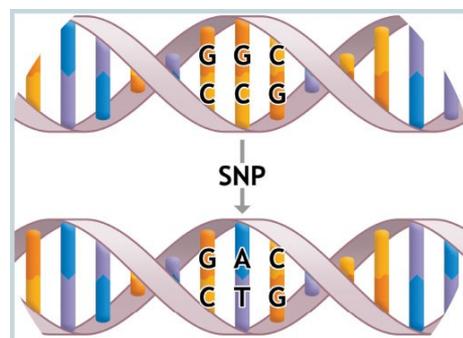


Figura 22 - Representação de polimorfismo de nucleótido único (SNP). Retirada e adaptada de: página de internet <http://grupogudic.blogspot.pt/2014/06/patrones-de-migracion-y-el-dna.html>

SNPs nos genes de citocinas poderão ser um fator de risco para doenças periodontais. O aumento da prevalência do genótipo GG foi observado no polimorfismo IL-6-174 e pode contribuir para o desenvolvimento da periodontite. O polimorfismo IL6R 148892 A/C pode também agir como fator de risco para a periodontite. Foram também identificados polimorfismos no gene da IL-1 $\beta$  13953, -511, -31, em que o IL-1 $\beta$  13953 é o SNP mais estudado na sua relação com a severidade da periodontite e foi associada uma produção de IL-1 $\beta$  quatro vezes superior em relação ao normal, o que pode explicar a forte associação com a severidade da periodontite. Finalmente, no que toca às interleucinas, foi ainda encontrado o polimorfismo IL12RB2 que influencia as respostas mediadas por células imunes nos periodontopatogénios, e favorece a suscetibilidade para a doença periodontal (Karthikeyan et al., 2014).

As variações genéticas humanas nos genes que codificam para a IL-1 são presumidos como envolvidos nas desordens inflamatórias. Win, Pan e Lin, (2016) efetuaram uma meta-análise com o objetivo de concluir se existe de facto alguma relação entre os polimorfismos da IL-1 e o risco para a periodontite. Para isso estudaram o polimorfismo IL-1 $\alpha$  rs17561 e o polimorfismo IL-1 $\beta$  rs1143634 e concluíram que se pode estabelecer uma relação positiva para a suscetibilidade para a periodontite no caso do polimorfismo IL-1 $\alpha$  rs17561, que está associada ao alelo T; relativamente ao polimorfismo IL-1 $\beta$  rs1143634 também se revelou implicado na periodontite ligada ao alelo T, com as cadeias genótipas TC + TT com um risco superior.

Outros polimorfismos de relevância para a doença periodontal são os dos TLR que são considerados a chave sensorial do sistema imune inato. Dos SNPs encontrados e identificados, os genes do TLR4 e CD14 relevaram uma relação positiva para o aumento do risco de infeções gram-negativas e subsequente aumento da suscetibilidade para a periodontite, e o gene polimórfico Asp299Gly TLR4 encontra-se associado à redução do risco para a periodontite agressiva, mas não para a periodontite crónica (Karthikeyan et al., 2014).

A reabsorção óssea pelos osteoclastos é um dos principais sintomas das doenças periodontais. O rácio RANK/OPG representa um papel fundamental da homeostase e equilíbrio da reabsorção/deposição óssea. A génese osteoclástica é controlada por três membros da superfamília de recetores TNF: (1) o RANKL; (2) RANK; e (3) a OPG. Os SNPs da OPG são OPG950 C/T e 118 G/C estão associados à peri-implantite mas não se encontrou nenhuma associação significativa para a periodontite crónica. Os polimorfismos da RANK demonstraram um efeito mínimo na patogenicidade da periodontite agressiva (Karthikeyan et al., 2014).

## 1.8. Tratamento e prevenção

A etologia da doença periodontal está distintamente associada à placa dentária e aos depósitos bacterianos acumulados nas superfícies dentárias, deste modo é recomendado remover esta aposição bacteriana (Gurav, 2016).

A fase inicial da terapêutica periodontal é denominada como não cirúrgica, e consiste na raspagem e alisamento radicular de ambas as superfícies dentária e radicular. O desbridamento periodontal é considerado o “*gold standard*” da terapêutica periodontal, e envolve a remoção mecânica dos depósitos bacterianos através de instrumentos manuais (curetas) e ultrassônicos (destartarizador)(Gurav, 2016). Os destartarizadores facilitam a remoção dos grandes depósitos de cálculo, ao gerar uma vibração de alta frequência (25000-42000 Hertz) na ponta ultrassônica. O alisamento radicular pode, no entanto, ser insuficiente na eliminação completa dos periodontopatogênicos, dado que podem existir bolsas muito profundas, concavidades, áreas de furca envolvidas e outras zonas de difícil acesso para estes instrumentos. É, no entanto, possível optar por uma abordagem cirúrgica com a finalidade de aumentar o campo de visão das áreas afetadas, e através da mesma efetuar a remoção mecânica (Gurav, 2016).

Dadas as possíveis limitações dos instrumentos mecânicos, os antibióticos sistêmicos podem representar um adjuvante de peso no tratamento da periodontite. Estes antibióticos estão recomendados como adjuvantes à terapêutica mecânica e não como terapêutica única. Apesar de eficaz a administração de antibióticos por via sistêmica, a administração local revelou melhores resultados. A administração de agentes antibióticos localmente na bolsa periodontal é efetuada sob a forma de fibra, gel, microesferas ou chip. Esta forma de administração do antibiótico neutraliza os efeitos adversos relacionados com a administração sistêmica e promove uma concentração de fármaco elevada nas localizações periodontais que se pretende atingir (Gurav, 2016).

Além da antibioterapia há outras terapêuticas periodontais adjuvantes ao alisamento e raspagem dentárias, entre elas: a terapia fotodinâmica e lasers. Os lasers têm vindo a ser utilizados como substituto e adjuvante ao tratamento periodontal mecânico. No tratamento periodontal a irradiação por laser é usada para a remoção do cálculo e desintoxicação da superfície radicular afetada, remoção do revestimento epitelial e do

tecido de granulação. O laser apresenta ainda um potencial efeito de bio estimulação nas células vizinhas do tecido alvo, deste modo abreviando a inflamação e promovendo a cicatrização dos tecidos periodontais (Gurav, 2016).

A periodontite é uma causa da danificação dos tecidos pela expressão de mediadores inflamatórios pelo hospedeiro como a IL, PGE<sub>2</sub>, MMP. Por esta razão, pode-se considerar como terapêutica coadjuvante a terapia de modulação do hospedeiro, que na periodontite consiste em administrar doses inferiores às necessárias para o efeito antimicrobiano do antibiótico (como a doxiciclina), em anti-inflamatórios não esteroides (como flurbiprofeno) e anti-absorventes ósseos (como os bifosfonatos). Os agentes moduladores do hospedeiro podem agir contra a expressão dos mediadores inflamatórios e parar as vias de sinalização inflamatórias celulares (Gurav, 2016).

Os antibióticos administrados por via sistêmica atingem os tecidos periodontais por via serológica, onde obtêm acesso aos microrganismos que eram inacessíveis pela terapêutica periodontal mecânica. De acordo com a AAP, os pacientes que podem vir a beneficiar de antibioterapia são os, em que a terapêutica periodontal mecânica se revelou ineficaz/insuficiente, os que sofrem de infecções periodontais agudas (PUNA e abscessos periodontais) ou que sofrem de periodontite agressiva, alguns pacientes medicamente comprometidos e em pacientes fumadores (Villagrana e Clavel, 2012). A periodontite provocada pela *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* frequentemente requer antibioterapia, pois esta bactéria dispõe-se em todas as superfícies da membrana mucosa da cavidade oral e tem a capacidade de invadir quaisquer tecidos moles. A Amoxicilina associada ao Ácido Clavulânico é um fármaco de amplo espectro que atinge baixas concentrações no fluido gengival (Bidault, Fred, Chandad e Grenier, 2007). O Metronidazol é um agente eficaz no tratamento da periodontite refratária com o envolvimento da *Porphyromonas gingivalis* e/ou *Prevotella intermedia*, pois atinge concentrações desejáveis antibacterianas no fluido gengival e tecidos gengivais, no entanto quando administrado por via oral tem um fraco impacto na microflora oral. As Tetraciclina (doxiciclina e minociclina) são agentes ativos importantes no combate a periodontopatógenios como a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, uma vez que possuem propriedades anti-colagenase, reduzem a destruição tecidular e a reabsorção óssea, e a sua administração por via sistêmica atinge níveis de concentração relativamente altos no

fluido gengival. A Clindamicina é eficaz no tratamento da periodontite refratária e contra cocos gram-positivos e bacilos anaeróbicos gram-negativos, mas tem uma baixa eficácia contra a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Este antibiótico deve ser usado com precaução por aumentar o risco de supercrescimento da *Clostridium difficile*. O supercrescimento da *Clostridium difficile* pode dar origem a uma colite pseudomembranosa (Bidault et al., 2007). A Ciprofloxacina é útil contra diversos periodontopatogénios, inclusive a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, este antibiótico penetra eficazmente nos tecidos periodontais afetados por doença e atinge concentrações mais elevadas ao nível do fluido gengival que a nível serológico. A Amoxicilina em combinação com o Metronidazol revelou-se um conjugado antibiótico potente, que revela melhorias clínicas periodontais a curto-prazo, dado o efeito sinérgico de supressão da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tanto na periodontite agressiva como na periodontite crónica (Villagrana e Clavel, 2012).

A resistência antibiótica está a tornar-se uma ameaça geral, em que muitos dos antibióticos se estão a tornar inúteis/ineficazes contra doenças importantes, pelo que tem aumentado a necessidade de minimizar o uso de antibióticos como também desenvolver um tratamento e prevenção de doenças sem antibioterapia. A remoção mecânica da placa supragengival é o método mais eficaz de prevenção da gengivite, todavia muitos são os que não praticam o controlo de placa de forma adequada o que mantém a alta prevalência da gengivite. Para combater este obstáculo, foram desenvolvidos produtos antimicrobianos sob a forma de dentífricos e colutórios que têm sido testados pela sua eficácia adjuvante na redução de placa e da gengivite. Entre eles está a clorhexidina que é considerada o “*gold standard*” na prevenção de formação de placa dentária. No entanto, não é desprovida de efeitos adversos como a coloração acastanhada dos dentes, erosão da mucosa oral e sabor amargo. Os colutórios antibacterianos atuam através da redução não específica dos níveis bacterianos tanto benéficos como patogénicos e devem sempre ser usados como adjuvantes do controlo mecânico e não como substituto (Nadkerny et al., 2015).

É importante realçar que a gengivite é facilmente reversível com uma adequada higiene oral. A eficaz remoção de placa bacteriana favorece o retorno dos tecidos gengivais a um estado de saúde em poucos dias (Wade, 2013). No caso da GUNA o ade-

quando tratamento normalmente previne a progressão da doença e cura a úlcera em apenas alguns dias. Contudo, o não tratamento da GUNA pode levar a uma forma mais severa da doença – periodontite ulcerativa necrosante aguda (PUNA) (Mizrahi, 2014). O tratamento desta periodontite peculiar inclui várias terapêuticas em conjunto: (1) remoção mecânica da placa dentária; (2) administração de peróxido de hidrogénio sob a forma de colutório – aumenta a disponibilidade de oxigénio às bactérias anaeróbias e assim previne o seu crescimento; e (3) administração de gluconato de clorhexidina sob a forma de colutório – efeitos anti-plaquetários (Zia et al., 2015).

O tratamento do abscesso periodontal deve incluir duas etapas (Marquez, 2013). Inicialmente para tentar controlar a lesão aguda, deve-se drenar a bolsa através da instrumentação da superfície subgingival, e se necessário efetuar uma incisão no abscesso. Se o dente mostrar uma grande perda de inserção e o seu prognóstico for mau, deve-se proceder à sua extração. De seguida, deve-se procurar a origem da lesão que normalmente deve tomar início 7 a 14 dias após o controlo da lesão aguda, e inclui cirurgia de retalho, essencialmente nas zonas de bolsa profunda intraóssea. No caso das lesões endodônticas, o tratamento passa pelo desbridamento e remoção dos tecidos afetados e causa da lesão, e conclui-se com o tratamento endodôntico dentário (selar dos canais dentários com gutta-percha e cimento) (Jivoinovici et al., 2014). A administração de antibióticos é apenas recomendada se houver um envolvimento sistémico evidente (Marquez, 2013).

A limpeza dentária para a remoção da placa dentária e outros depósitos dos dentes é o mecanismo, que se efetuado de forma adequada é eficaz na prevenção de doenças como a cárie e doenças periodontais (Azodo e Agbor, 2015). As técnicas de escovagem dentária são várias, contudo em pacientes periodontais a descrita como mais indicada é a Técnica de Bass, pois estima-se que se efetuada corretamente, permite alcançar uma profundidade de 0,5mm no sentido subgingival. Esta técnica consiste na colocação da cabeça da escova numa direção oblíqua com as cerdas voltadas para a raiz do dente (45°), para que as cerdas entrem no sulco gengival, de seguida a escova deve efetuar movimentos ântero-posteriores rítmicos curtos (no máximo de dois em dois dentes). Para complementar a escovagem deve-se usar fio dentário ou fita dentária e/ou colutório (Nassar et al., 2013).

## 2. Probióticos

O termo “probióticos” começou com Elie Metchnikoff (1907), que se referiu aos mesmos como bactérias em que os produtos fermentados podiam competir com microrganismos nocivos para o hospedeiro e assim beneficiar a saúde do mesmo. Desde então, têm surgido várias definições, existindo autores que os definem como microrganismos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios para a saúde do hospedeiro (He, Lux, Kuramitsu, Anderson e Shi, 2009). A mais recente, de Selle e Klaenhammer (2013), diz que “probióticos são microrganismos que estão associados a diversos benefícios para a saúde, relacionados com a manutenção da homeostasia das mucosas e do sistema imunitário, que têm potencial para melhorar a saúde humana através de aplicações profiláticas e terapêuticas”. Chandler (2014) acrescenta a esta última definição que são organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios para a saúde para além do próprio valor nutricional. Por último, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, “as bactérias probióticas são organismos vivos que conferem benefícios para a saúde do hospedeiro quando administrados em quantidade adequadas” (Report, 2015).

O termo “probióticos” abrange um vasto espectro de microrganismos em que a maioria são bactérias mas também estão incluídas algumas leveduras, e cada espécie possui várias estirpes com variados efeitos promotores de saúde (Weichselbaum, 2009). Antes de ser definido este termo, já na literatura Romana Clássica, há relatos da sua aplicação, que consistia em fermentar a comida com microrganismos com finalidade terapêutica (Teughels, Van Essche, Sliepen e Quiryneen, 2008).

### 2.1. Requisitos ideais

Os critérios ideais para os probióticos orais são: (1) devem aderir/colonizar os tecidos dentários e fazer parte do biofilme; (2) não devem fermentar açúcares, pois estes baixam o pH, o que é prejudicial à saúde oral (Reddy e Narendera Babu, 2011). Mais recentemente, Chandler (2014) expõe outra vertente de critérios e enumera que os pro-

bióticos não devem possuir: (1) patogenicidade; (2) toxicidade; (3) ser mutagênicos ou carcinogênicos.

As bactérias usadas como probióticos são não patogênicas, como *Lactobacillus spp.* ou *Bifidobacterium spp.*, *Enterococcus faecium*; também se podem usar leveduras como a *Sascharomyces boulardii* (Tekce et al., 2015).

## 2.2. Mecanismos de ação

Os organismos probióticos são normalmente usados para tratar infecções do trato gastrointestinal e urogenital, doenças atróficas, infecções orofaríngeas, otite aguda média, faringotonsilite streptococcal, próteses vocais, gestão de cáries, infecções periodontais bacterianas e fúngicas, e halitose (Reddy e Narendera Babu, 2011).

Os principais mecanismos promotores de saúde atribuídos aos probióticos são a capacidade destes organismos conseguirem aumentar a defesa imune da mucosa intestinal e a atividade macrofagocitária, e elevar o número de células killer, linfócitos T e interferões. Para mostrar eficácia contra infecções orais, as bactérias probióticas têm de aderir à mucosa oral e aos tecidos dentários ao integrar o biofilme e competir com os patogênicos dentários. As espécies mais frequentemente utilizadas são do género *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*, por estes organismos já serem produzidos na indústria láctica e por raramente se mostrarem implicados em infecções nos humanos (Lodi, Oliveira, Brighenti, Delbem e Martinhon, 2015).

Os benefícios das bactérias probióticas são: (1) conferem nutrientes e cofatores ao hospedeiro; (2) competem diretamente com os patogênicos; (3) interagem com os fatores de virulência dos microrganismos patogênicos; e (4) estimulam o sistema imunitário do hospedeiro (Reddy e Narendera Babu, 2011). Em humanos, a bactéria *Lactobacillus gasseri* mostrou vários efeitos benéficos para a saúde através da atividade antimicrobiana, da produção de bacteriocinas e da imunomodulação dos sistemas inato e adaptativo (Selle e Klaenhammer, 2013). Outra espécie de lactobacilo, a *Lactobacillus reuteri* promove a formação de reuterina, proteína que se pensa ser responsável por manter

a microbiota saudável, pela prevenção do supercrescimento de outros microrganismos patogênicos, e ainda se pensa que pode reprimir os mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-1 $\beta$  (Tekce et al., 2015).

Os probióticos podem não só suprimir o aparecimento de patogênicos, como prevenir uma superinfecção com patogênicos exógenos, e ainda conferir proteção pela promoção de resposta imunitária. Na cavidade oral, os probióticos podem criar um biofilme, ao atuar como barreira que reveste os tecidos orais contra doenças. Este biofilme mantém as bactérias patogênicas fora dos tecidos orais por ocupação do meio que as mesmas iriam invadir, competindo os probióticos com bactérias cariogênicas e com agentes patogênicos periodontais (Reddy e Narendera Babu, 2011).

No ano de 2015 Terai et al., ao avaliar candidatos para probióticos (em ratos), concluíram que haviam quatro espécies isoladas *Lactobacillus crispatus* YIT 12319, *Lactobacillus fermentum* YIT 12320, *Lactobacillus gasseri* YIT 12321 e *Streptococcus mitis* YIT 12322, que poderiam ser considerados potenciais probióticos. Neste estudo, estas bactérias demonstraram os mecanismos desejáveis para os probióticos: não produzem substâncias sulfúricas voláteis; possuíam alta atividade antibacteriana contra as bactérias patogênicas orais; elevada atividade de adesão às células epiteliais orais (*in vitro*); não apresentavam potencial cariogênico; e revelavam um baixo risco para a endocardite bacteriana.

A capacidade dos probióticos aderirem às superfícies revestidas por saliva foi verificada nos *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei*, observando-se que mais de 20% demonstram esta capacidade de adesão. Em 2009 Haukioja et al. observaram que probióticos lactobacilos (*Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei* ATCC 11578) poderiam afetar a ecologia oral, ao prevenir especificamente a adesão por parte de outras bactérias e modificarem a composição proteica da película salivar (Stamatova e Meurman, 2009). Estes autores consideraram que as bactérias probióticas seriam capazes de modificar a composição proteica da película salivar por duas vias diferentes: pela adesão e pela degradação das proteínas salivares (Stamatova e Meurman, 2009). Outro estudo demonstrou a capacidade dos microrganismos para se integrarem nas comunidades microbiais orais e de se coagregarem à *Fusobacterium nucleatum*. Os estudos *in vitro* revelaram que a *Lactobacillus ca-*

*sei* 921 e a *Lactobacillus rhamnosus* 11.4 conseguem coagregar-se à *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10 255 em pelo menos 90% dos casos (Stamatova e Meurman, 2009).

### 2.3. Potenciais riscos

Os probióticos têm uma excelente evidência de segurança, no entanto devem ser usados com precaução, especialmente na cavidade oral e em determinadas doenças, pois podem não ser desprovidos de riscos quando se trata de certos grupos de indivíduos, como é o caso de imunocomprometidos e neonatos prematuros (Singhi e Kumar, 2016).

A maior partes das estirpes de probióticos disponíveis comercialmente são consideradas seguras, contudo existem algumas preocupações no que diz respeito à segurança quando usadas em pacientes severamente debilitados ou imunodeprimidos (Singhi e Kumar, 2016). No caso da *Lactobacillus rhamnosus* que pertence naturalmente à flora oral, rectal e vaginal, existem casos relatados de abscesso hepático devido à lactobacilemia e endocardite infecciosa. A sépsis por *Lactobacillus spp.* Que se encontra documentada em apenas alguns artigos, pensa-se estar diretamente ligada à ingestão de suplementos probióticos, especialmente em pacientes imunocomprometidos e com endocardite. No caso de neonatos prematuros, também foram relatados recentemente casos de bacteriemia por administração de *Bifidobacterium longum* como probiótico.

### 3. Probióticos na prevenção da doença periodontal: estado da arte

Diariamente, todos os seres humanos ingerem um grande número de organismos vivos, predominantemente bactérias. Estes organismos estão naturalmente presentes nos alimentos e na água, no entanto também podem ser deliberadamente adicionados durante o processamento alimentar como molhos, queijo, iogurte e produtos lácticos fermentados. Por várias décadas, os probióticos têm sido adicionados a alguns alimentos devido aos seus efeitos benéficos para a saúde humana (Singh, Sharma, Babu, Singla e Rizwanulla, 2013). As bactérias probióticas que têm vindo a ser utilizadas nas várias partes do mundo são:

- *Bifidobacterium bifidum*
- *Bifidobacterium breve*
- *Bifidobacterium lactis* (L1A)
- *Bifidobacterium longum* (SBT-2928; BB536)
- *Bifidobacterium spp.*
- *Lactobacillus acidophilus* (5; 7; NCFB 1748; SBT-2062)
- *Lactobacillus bulgaricus*
- *Lactobacillus casei* Shirota
- *Lactobacillus helveticus*
- *Lactobacillus helveticus*
- *Lactobacillus johnsonii* Lal
- *Lactobacillus plantarum* 299v
- *Lactobacillus reuteri*
- *Lactobacillus rhamnose* ATCC53103

A *fomA* é uma porina da membrana externa da *Fusobacterium nucleatum*, que permite a adesão da bactéria à superfície dentária e mucosa oral ao aderir ao péptido salivar derivado da estaterina; é também responsável pela regulação da permeabilidade do biofilme. Esta proteína é de extrema importância para o processo de coaglutinação da *Fusobacterium nucleatum* com outras bactérias orais (Ma, Ding, Feng e Li, 2013).

Na prevenção da doença periodontal foi investigado em ratos, a *fomA* expressa em *Lactobacillus acidophilus*. Neste estudo, foi fabricada uma espécie recombinante da *Lactobacillus acidophilus* que expressasse a proteína *fomA* da *Fusobacterium nucleatum*, e que detetasse no soro IgG específica para a *fomA* e na saliva IgA. Verificou-se nos ratos imunizados com a bactéria recombinante, os anticorpos IgA específicos para a *fomA* na saliva. Estes anticorpos podem exercer efeitos antagonistas nos patógenos periodontais. No teste de adesão, determinaram que em comparação com o grupo controle, o número de colônias da *Porphyromonas gingivalis* tinha diminuído significativamente no grupo experimental, pelo que é possível que o anticorpo da anti-*fomA* tenha bloqueado a copolimerização da *Porphyromonas gingivalis* e da *Fusobacterium nucleatum*, e por consequência tenha indiretamente bloqueado a adesão da *Porphyromonas gingivalis* aos 24 poços da placa. Além disso, neste estudo, combinaram as espécies *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* para originar um modelo de abscesso na gengiva dos ratos. De modo a avaliar a severidade do abscesso resultante e a possibilidade de usar a espécie recombinante como vacina periodontal. Para isso mediu-se a dimensão do abscesso e determinaram-se os níveis de fatores de inflamação IL-1 $\beta$  nas amostras de soro de rato e nos tecidos gengivais locais. Os resultados revelaram que os abscessos gengivais no grupo experimental de ratos era menos severo que no grupo de controle. Os níveis de IL-1 $\beta$  nas amostras de soro e dos tecidos gengivais locais, era também menor que no grupo de controle. Estes resultados mostraram-se consistentes com estudos *in vitro*, ao comprovar que bloquear a *fomA* inibe a patogenicidade da *Porphyromonas gingivalis* e da *Fusobacterium nucleatum*. Em suma, concluiu-se que a administração oral da bactéria *Lactobacillus acidophilus* a exprimir a proteína *fomA*, reduzia o risco de infecção periodontal pelas espécies *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* (Ma et al., 2013).

Recentemente, foi efetuado um estudo, onde se investigou se o tratamento tópico com *Lactobacillus brevis* CD2 poderia inibir a perda óssea periodontal em ratos, característica da periodontite, com a probabilidade de levar à perda de dentes (Maekawa e Hajishengallis, 2014). Ratos C57BL/6 masculinos com seis semanas de idade, foram tratados três vezes ao dia com *Lactobacillus brevis* CD2 ( $8.2 \times 10^5$  bactérias por  $1\text{mm}^2$  de ligadura) ou com placebo (ligadura igual sem bactéria). Em cada rato, tanto no grupo controle como no grupo experimental, a ligadura foi aplicada topicamente entre a gen-

giva e a mucosa bucal correspondente ao dente ligado à indução da periodontite. A periodontite foi induzida 1 dia após o início do tratamento com *Lactobacillus brevis* CD2 ou placebo, em que se prendeu uma ligadura de seda 5-0 à volta do segundo molar maxilar esquerdo. O molar contra lateral de cada rato foi deixado como base de controlo para as medições ósseas. As ligaduras permaneceram em todos os ratos durante todo o período experimental. Como resultados, os ratos tratados topicamente com a *Lactobacillus brevis* CD2 mostraram uma perda óssea menor em aproximadamente 60% quando comparados com os tratados com o placebo. Na investigação, também acederam à expressão do mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) de citocinas pró-inflamatórias na gengiva dissecada de ratos dos dois grupos. A expressão de citocinas associadas à perda óssea periodontal inflamatória citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17), foi encontrada nas ligaduras de ratos tratados com placebo. Por outro lado, os ratos tratados com *Lactobacillus brevis* CD2 revelaram uma diminuição significativa na expressão de todas as citocinas pró-inflamatórias testadas (Figura 23). Concluiu-se que, em ratos, a *Lactobacillus brevis* pode inibir a inflamação periodontal e a perda óssea, e modular o microbioma oral para um microbioma mais favorável ao crescimento de bactérias aeróbicas em detrimento de bactérias anaeróbicas, que estão normalmente associadas à periodontite. Estes resultados sugerem, mas obviamente não provam, que os probióticos podem ter um potencial terapêutico na periodontite humana, possivelmente tanto a nível anti-inflamatório como a nível antimicrobiano (Maekawa e Hajishengallis, 2014).

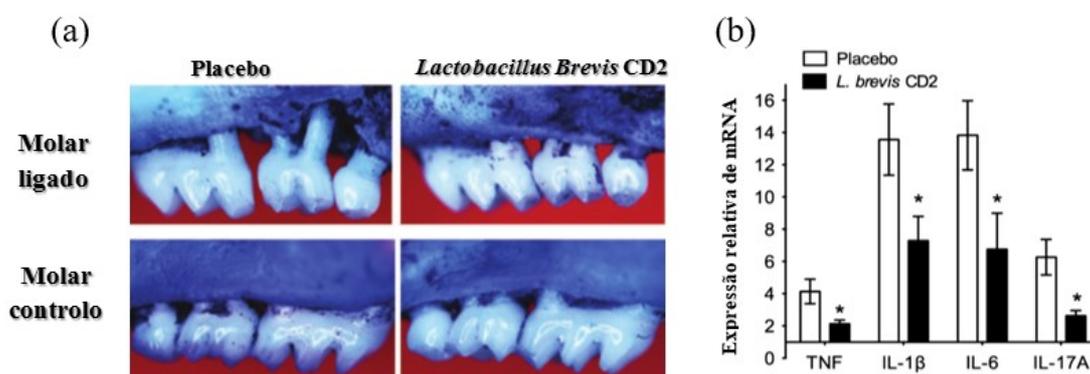


Figura 23 – (a) ilustração do efeito do tratamento com placebo e com *Lactobacillus brevis* CD2 em ratos. (b) representação da expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias (TNF; IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17A), nos grupos placebo e tratados nos com *Lactobacillus brevis* CD2. Retirada e adaptada do artigo “Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss” (Maekawa e Hajishengallis, 2014).

A *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é uma bactéria gram-negativa que coloniza a cavidade oral de um terço ou mais da população acima dos 18 anos de idade. Esta bactéria está altamente indicada como o agente causal da periodontite agressiva. Estudos recentes apontaram para a importância da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nesta doença, em particular o clone altamente leucotóxico (JP2), na iniciação da perda de inserção em indivíduos jovens (Gonçalves et al., 2013).

.Os principais fatores de virulência da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* são de facto as leucotoxinas e as toxinas distensoras citoletais (CDTs), que são proteínas exotoxinas que têm como alvo as células do sistema imune ou os tecidos periodontais. As CDTs podem provocar a inibição do crescimento e eventualmente da apoptose das células eucarióticas, enquanto as leucotoxinas podem seletivamente destruir células leucocitárias humanas, ou ativa-las a produzir uma forte resposta pró-inflamatória (Nissen, Sgorbati, Biavati e Belibasakis, 2014).

Foi efetuado um estudo de modo a investigar o efeito da secreção de produtos de *Lactobacillus* (*Lactobacillus salivarius* OMZ520 e *Lactobacillus gasseri* OMZ525) na expressão das leucotoxinas (Lts) e da toxina distensora citoletal da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em cultura planctónica. Os resultados indicam que as duas espécies de lactobacilos competiam com a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Figura 24). A atenuação da expressão de ambas as toxinas aparece visível às 3 horas, e não é compatível com a redução do crescimento da *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. O efeito na expressão da Lts parece estar mais dependente do tempo do que o efeito na expressão de CDTs. Estes resultados sugerem que os probióticos poderão ser úteis para combater as bactérias patogénicas da boca (Nissen et al., 2014).

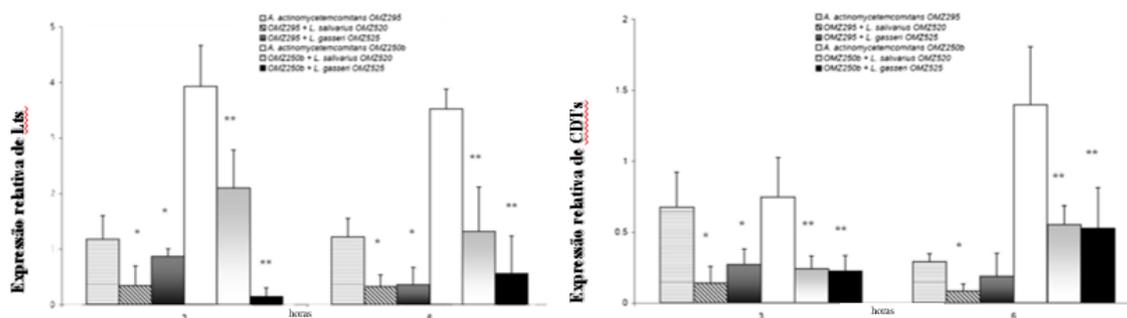


Figura 24- Expressão relativa de Lts e CDTs às 3 e às 6 horas. \*, \*\* - diferença estatisticamente significativa. Retirada e adaptada de: artigo “*Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus gasseri* down-regulate *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* exotoxins expression” (Nissen et al., 2014)

Com o objetivo de se averiguar se os probióticos sob a forma de colutório tinham potencial anti-inflamatório e anti-placa, foi desenvolvido um estudo num total de 45 indivíduos sistemicamente saudáveis (Nadkerny et al., 2015). Os critérios de inclusão foram: (1) indivíduos entre os 20 e 30 anos de idade; (2) com gengivite crónica; (3) com  $\geq 20$  dentes disponíveis (mínimo de 5 dentes por quadrante). Critérios de exclusão foram: (1) história de doenças sistémicas; (2) grávidas ou em período de aleitamento; (3) história de antibioterapia nos últimos 3 meses; (4) história de profilaxia oral nos últimos 6 meses anteriores ao estudo; (5) respiradores orais; (6) portadores de aparelho ortodôntico ou próteses; (7) com hábitos deletérios, como o tabagismo; (8) história de terapêutica periodontal não cirúrgica ou cirúrgica nos últimos 6 meses (Nadkerny et al., 2015).

Todos os sujeitos foram avaliados quanto à placa (IP), inflamação gengival (IG) e quanto ao índice de higiene oral simplificado. Para a execução do índice de higiene oral simplificado (IHOS), é necessário dividir a cavidade oral em sextantes, em que será avaliado o índice de placa e índice de cálculo de uma única superfície de um dente por cada sextante (exemplo: 16, 11, 26, 36, 31, 46) (Nadkerny et al., 2015). No IHOS, o índice de placa corresponde à avaliação de placa na coroa clínica, em que os códigos são: 0 – não há placa; 1 – até 1/3 do dente está coberto por placa; 2 – entre 1/3 e 2/3 do dente está coberto por placa; 3 – mais de 2/3 do dente está coberto por placa; e a avaliação do índice de cálculo corresponde aos códigos: 0 – não há cálculo; 1 – presença de cálculo supragengival até 1/3 do dente; 2 – presença de cálculo entre 1/3 a 2/3 do dente

ou presença de pequenas porções de cálculo subgengival; 3 – presença de cálculo sobre mais de 2/3 do dente ou uma faixa contínua de cálculo subgengival ao longo da região cervical dentária. Por cada dente, a pontuação máxima possível é de 6 e a mínima é 0. O cálculo do IHOS de toda a cavidade oral é o resultado da soma das pontuações dos índices de placa e cálculo, a dividir pelo número de dentes examinados.

A classificação das pontuações é a seguinte: boa – 0,1 a 1,2; normal – 1,3 a 3,0; má: 3,1 a 6,0. Os 45 sujeitos foram divididos por três grupos: Grupo A – colutório com probiótico (Sporlac Plus<sup>®</sup> + água destilada); Grupo B – colutório com clorhexidina 0,02% (Hexidine<sup>®</sup>); Grupo C – controlo (salino). Aos pacientes do grupo A, foram cedidas saquetas de Sporlac Plus<sup>®</sup> (fórmula probiótica que contém *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sporogenes*, *Bifidobacterium longum* e *Saccharomyces boulardii*) e ampolas de 10ml de água. Foi demonstrado e instruído aos pacientes, os procedimentos de preparação do colutório experimental ao misturar o conteúdo da saqueta em 10ml de água destilada, com a indicação de que a solução só estaria pronta quando o conteúdo se encontrasse completamente dissolvido na água destilada (Nadkerny et al., 2015). Aos três grupos recomendou-se bochechos com os respectivos colutórios durante 15 dias sem nenhuma diluição, durante 1 min, 2 vezes por dia, 30 minutos após a escovagem; após o bochecho não deveriam comer nada durante outros 30 minutos. Os parâmetros clínicos IP, IG e IHOS foram efetuados como ponto de partida e repetidos nos dias 14 e 28. Os resultados deste estudo indicam que nos três grupos, os parâmetros clínicos se encontravam significativamente diminuídos passados os 30 dias, o que significa que até o grupo salino teria algum efeito. Este resultado no grupo placebo pode ser atribuído ao efeito Hawthorne - os indivíduos para mostrar resultados, alteram ou melhoram algum aspeto no seu comportamento como resposta à consciencialização de estarem a ser observados. A combinação de destartarização associada a probióticos e destartarização associada a clorhexidina, demonstrou uma redução significativa nos parâmetros clínicos de avaliação quando comparados com o grupo destartarização e controlo salino. Neste estudo, o grupo salino foi usado como controlo negativo e o grupo de clorhexidina foi usado como controlo positivo para a possível comparação com o grupo de probióticos. Os resultados obtidos revelam que os bochechos com probióticos têm um potencial positivo anti-placa e eficácia na redução da acumulação de placa e inflamação gengival quando comparado com a clorhexidina.

Conclui-se portanto, que aparte o sabor desagradável que o colutório com probióticos possui, não havia efeitos adversos por 30 dias, o que leva a crer que o uso desta substância tem um potencial terapêutico válido, e que devem ser efetuados mais estudos a longo-prazo para determinar a sua eficácia (Nadkerny et al., 2015).

Os efeitos dos probióticos são espécie-específicos, assim cada espécie de bactéria deve ser testada separadamente e os efeitos descritos para uma espécie não podem ser transportados para outras. No estudo referenciado anteriormente, o colutório que continha probióticos era composto por uma combinação de bactérias – *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* e *Sacchromyces spp.* (Nadkerny et al., 2015). É possível que, dada a complexidade da cavidade oral, um cocktail probiótico de várias espécies seja mais eficaz que um único agente probiótico. É também necessária a avaliação destas *Lactobacillus spp.*, quanto ao seu tempo de colonização oral, ainda assim, parece plausível a sua administração prolongada como prevenção para o desenvolvimento da placa e gengivite.

Das *Lactobacillus spp.* com possíveis características probióticas, a *Lactobacillus reuteri* está entre as mais promissoras graças à sua capacidade de formação de reuterina, que está envolvida na manutenção de uma microbiota saudável, pois previne o supercrescimento de outros microrganismos patogênicos. Esta bactéria, é ainda capaz de reprimir mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-1 $\beta$  (Tekce et al., 2015). Pelas razões apresentadas, foi efetuado um estudo de modo a testar clínica e microbiologicamente os efeitos da administração de pastilhas com *Lactobacillus reuteri* para o tratamento da periodontite crônica durante 1 ano (Tekce et al., 2015). Os parâmetros de inclusão para este estudo foram: (1) pacientes com periodontite crônica com perda óssea horizontal detetável radiograficamente; (2) presença de pelo menos 2 dentes com uma localização proximal com sondagem de 5 a 7mm; (3) índice gengival  $\geq 2$  em cada quadrante. Os critérios de exclusão foram: (1) tratamento periodontal ou antimicrobiano nos últimos 6 meses; (2) doenças sistêmicas; (3) fumadores; (4) gravidez; (5) uso de suplementos probióticos; (6) história de reações adversas à lactose ou a produtos lácticos fermentados.

Segundo estes critérios, o total de indivíduos no estudo foi de 40 pessoas, distribuídos por dois grupos: Grupo I – destartarização e alisamento radicular (AR) e admi-

nistração de pastilhas contendo probióticos; Grupo II – AR e administração de pastilhas placebo (Tekce et al., 2015). Para as amostras microbiológicas, foram selecionados pelo menos 2 dentes com uma localização interproximal com bolsa de 5 a 7 mm e um IG  $\geq 2$  em cada quadrante. Foram obtidas amostras de no mínimo 8 localizações e um máximo de 12 localizações em cada paciente. As amostras foram recolhidas no ponto de partida e nos dias 21, 90, 180 e 360, sempre nas mesmas localizações. Em toda a boca foram avaliados os parâmetros IP, IG, hemorragia à sondagem (HS) e profundidade de sondagem (PS), no início do estudo e nos dias 21, 90, 180 e 360, por um examinador calibrado através de uma sonda periodontal. O nível relativo de inserção foi observado como ponto de partida e aos dias 180 e 360. O IP e a HS foram utilizados como meio de avaliação do estado de higiene oral e de saúde gengival.

O resultado pretendido inicialmente era obter uma redução na profundidade de sondagem (Tekce et al., 2015). Neste estudo, o risco para a progressão da doença foi avaliado segundo a PS pelos seguintes parâmetros: baixo:  $\leq 4$  locais com  $PS \geq 5$ mm; moderado: 5-8 locais com  $PS \geq 5$ mm; alto: 9 locais com  $PS \geq 5$ mm. Além disto, uma localização era considerada como indicada para cirurgia se  $PS \geq 6$ mm ou se fosse 5mm com HS positiva. Todos os pacientes foram instruídos relativamente à execução de um adequado controlo de higiene oral uma semana antes de o estudo ter início. A todos os indivíduos do estudo foi indicada a administração das pastilhas 2 vezes por dia, durante 3 semanas, todas as manhãs e noites após a escovagem dos dentes. Foi também efetuado um questionário nos dias 21, 80, 180 e 360 com o objetivo de averiguar a conformidade e efeitos adversos. Como resultados deste estudo foi demonstrado que a administração de pastilhas contendo *Lactobacillus reuteri* era consistente com resultados melhores clínica e microbiologicamente quando comparados com o grupo placebo.

Uma grande redução da PS foi observada no grupo I desde o ponto de partida até aos dias 21, 90, 180 e 360, permanecendo estáveis durante todo o período de estudo (Tekce et al., 2015). Como os pacientes sob a administração de probióticos exibiam um PS significativamente menor e subsequente menor era o risco de progressão, e assim menos foram os indicados para cirurgia periodontal. O produto bacteriano da *Lactobacillus reuteri* – reuterina – apenas foi detetado até aos dias 21 e 90. Como não foi possível detetar que a *Lactobacillus reuteri*, nem reuterina nas bolsas periodontais nos dias

180 e 360, não é possível retirar nenhuma conclusão quanto ao seu efeito de suplemento a longo-prazo. Considerando a informação obtida por este estudo, os investigadores concluíram que este a *Lactobacillus reuteri* pode representar um adjuvante benéfico ao tratamento de pacientes com periodontite crónica.



### III- Conclusão

Esta revisão bibliográfica foi efetuada com o objetivo de verificar se é possível estabelecer uma ligação entre os probióticos e a doença periodontal, tanto na prevenção da doença como a sua administração coadjuvante ao tratamento mecânico, a partir dos estudos efetuados até à atualidade. A complexidade da doença periodontal e a sua prevalência são fatores motivacionais para que mais estudos sejam realizados e desenvolvidos.

A doença periodontal é uma patologia muito complexa, pelo que dos vários tipos (gingivite, periodontite crónica, periodontite agressiva, abscessos periodontais, lesões associadas à endodontia) se optou por incidir mais na periodontite crónica, dado que é o tipo mais comum das condições mais graves de doença periodontal, e por ser o estado mais frequentemente usado nos estudos dos probióticos orais.

Apesar da terapêutica mecânica ser o “*gold standard*” do tratamento da periodontite, a mesma apresenta limitações e a taxa de recidiva é ainda considerada bastante alta. Assim a introdução de tratamentos coadjuvantes pode representar uma mais-valia e proporcionar uma menor perda dentária a longo-prazo.

De entre os vários tratamentos coadjuvantes propostos, os antibióticos são os mais usados na atualidade, todavia tem-se que podem não ser desprovidos de riscos. A inadequada ou excessiva administração de um certo antibiótico pode levar à sua resistência por parte de espécies patogénicas importantes. Esta resistência faz com que a administração de antibióticos seja cada vez mais seletiva e comedida.

As condições que aumentam a suscetibilidade para a periodontite além dos fatores de risco são: (1) placa; (2) presença de espécies patogénicas; (3) redução ou ausência das consideradas bactérias benéficas. Com a terapia mecânica e com os mecanismos de higiene oral, tenta-se eliminar o primeiro fator, restando ainda dois fatores major. Com a antibioterapia como coadjuvante ao tratamento mecânico, apenas se incidia no segundo fator, ou seja, eliminar a presença de espécies patogénicas. Com esta linha de pensamento, algumas entidades científicas sugeriram uma outra abordagem

como coadjuvante à terapia mecânica capaz de lidar com os dois fatores restantes ao mesmo tempo. Com a introdução dos probióticos (bactérias benéficas), seria possível aumentar o número de bactérias benéficas e ao mesmo tempo reduzir as espécies patogênicas.

A própria designação de probióticos é que são microrganismos vivos (maioritariamente bactérias das espécies *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*) capazes de promover a saúde quando administrados nas quantidades adequadas.

Os mecanismos de ação hipotéticos podem ser mecanismos diretos: (1) envolvimento nas ligações de microrganismos com as proteínas orais (formação do biofilme), (2) ação sobre a formação da placa dentária e no seu complexo ecossistema, competindo e intervindo nas ligações/complexos bactéria-bactéria, (3) envolvimento no metabolismo de substratos (competindo com microrganismos orais de substratos disponíveis), (4) produção de produtos químicos que inibem as bactérias orais (substâncias antimicrobianas); e/ou mecanismos indiretos: (1) modular o funcionamento do sistema imune, (2) efeito de imunidade local, (3) efeito nos mecanismos de defesa não imunológicos, (4) regulação da permeabilidade da mucosa, (5) pressão na seleção do desenvolvimento da microflora oral, no sentido da colonização por espécies menos patogênicas. A partir desta proposta dos mecanismos de ação foram estudadas as bactérias mais prováveis para probióticos, nomeadamente os lactobacilos e as bifidobactérias.

Foi possível concluir, que a grande maioria dos estudos efetuados foram apenas *in vitro* e em modelos animais (ratos), e os que foram efetuados *in vivo* em humanos requeriam um prazo superior a fim de se verificar a segurança da sua aplicação. As investigações *in vitro* já têm vindo a ser desenvolvidas há muitos anos, no entanto dado os resultados contraditórios entre alguns autores não foi permitido ainda que se pudessem efetuar a longo prazo em humanos.

As últimas conclusões por partes dos autores dos estudos desenvolvidos tanto *in vivo* como *in vitro* revelam resultados promissores, levando a crer que no futuro a aplicação de probióticos com as finalidades propostas, pode vir a ser uma opção viável. Algumas espécies bacterianas revelaram possuir de fato alguns dos mecanismos de ação

propostos para a sua caracterização como probióticos, revelando um grande avanço neste campo de investigação.

Alguns autores levantaram a possibilidade de um complexo de probióticos, ao invés de um único probiótico, por cada espécie bacteriana possuir mecanismos diferentes. Ainda assim, há que averiguar quanto ao conjunto de espécies escolhidas, pois separadas podem possuir efeitos benéficos e sob a forma de complexo, possuir efeitos patogénicos.

De entre as espécies de *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*, os estudos desenvolvidos mais recentemente parecem estar cada vez mais próximos da escolha do microrganismo, ou do conjunto de microrganismos capazes de proporcionar a promoção da saúde oral. Além disso, apesar de os probióticos serem microrganismos integrantes da flora oral original, é ainda desconhecido o seu efeito a longo prazo pela falta de evidência científica existente atualmente, no entanto sabe-se também que se aplicados por um prazo específico curto, a tendência é para a flora se reestabelecer.

É também relevante mencionar que dada a grande variabilidade individual da flora microbiana e os fatores ambientais únicos a que cada indivíduo está sujeito, torna mais difícil detetar qual o agente patogénico ou complexo patogénico específico a combater, e desta forma dificulta também a opção probiótica mais adequada para cada indivíduo. Alguns autores são da opinião que a caracterização genómica individual poderá ser uma grande mais-valia para o progresso e aplicação futura destes microrganismos.

Com este trabalho de revisão bibliográfica o que se pode concluir é que, de facto, não há ainda resultados concretos a longo-prazo quanto aos efeitos dos probióticos. Todavia, os estudos efetuados em humanos, a curto-prazo, revelaram na sua maioria fatores positivos na prevenção da gengivite e por consequência da periodontite, bem como coadjuvante à terapia mecânica.



## IV – Bibliografia

- Albandar, J. M. (2014). Aggressive periodontitis: Case definition and diagnostic criteria. *Periodontology 2000*, 65(1), 13–26. <http://doi.org/10.1111/prd.12014>
- Andrade, R., Espinoza, M., Gómez, E. M., Espinoza, J., e Cruz, E. (2012). Intra- and inter-examiner reproducibility of manual probing depth. *Brazilian Oral Research*, 26(1), 57–63. <http://doi.org/10.1590/S1806-83242012000100010>
- Azodo, C. C., e Agbor, A. M. (2015). Gingival health and oral hygiene practices of schoolchildren in the North West Region of Cameroon. *BMC Research Notes*, 8, 385. <http://doi.org/10.1186/s13104-015-1350-2>
- Azodo CC, U. A. (2015). Periodontal Disease Awareness and Knowledge among Nigerian Primary School Teachers. *BMC Research Notes*
- Barnea, T. V., Sava, A., Gentimir, C., Goriuc, A., Boișteanu, O., Chelaru, L., ... Costuleanu, M. (2015). Genetic polymorphisms of TNFA and IL-1A and generalized aggressive periodontitis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 56(2), 459–464.
- Berezow, A. B., e Darveau, R. P. (2011). Microbial shift and periodontitis. *Periodontology 2000*, 55(1), 36–47. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00350.x>
- Bidault, P., Chandad, F., e Grenier, D. (2007). Systemic Antibiotic Therapy in the Treatment of Periodontitis. *Journal of Canadian Dental Association*, 73(6), 515–520.
- Bolerázska, B., Mareková, M., e Markovská, N. (2016). Review Article Trends in Laboratory Diagnostic Methods. *Department of Medical and Clinical BioChemistry Faculty of Medicine*, 143(suppl 10), 3–9.
- Chandler, M. (2014). Probiotics - not all created equally. *Journal of Small Animal Practice*, 55(9), 439–441. <http://doi.org/10.1111/jsap.12263>

- Chandra, A., Yadav, O. P., Narula, S., e Dutta, A. (2016). Epidemiology of periodontal diseases in Indian population since last decade. *Journal of International Society of Preventive & Comunity Dentistry* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27114945>
- Cifcibasi, E., Ciblak, M., Kiran, B., Badur, S., Firatli, E., Issever, H., e Cintan, S. (2015). The role of activated cytotoxic T cells in etiopathogenesis of periodontal disease: does it harm or does it heal? *Scientific Reports*, 5, 9262. <http://doi.org/10.1038/srep09262>
- Darveau, R. P. (2010). Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(7), 481–90. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2337>
- Dental Quirúrgic's. (n.d.). Sondas periodontales KOHLER. Retirado a 28 de Junho, 2016, de [http://www.dentalquirurgics.com/articulo\\_sondas-periodontales-kohler-136.aspx](http://www.dentalquirurgics.com/articulo_sondas-periodontales-kohler-136.aspx)
- Engebretson, S., e Kocher, T. (2013). Evidence that periodontal treatment improves diabetes outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(SUPPL. 14). <http://doi.org/10.1111/jcpe.12084>
- Genco, R. J., e Borgnakke, W. S. (2013). Risk factors for periodontal disease. *Periodontology 2000*, 62, 59–94. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x>
- Goldie, M. P. (2015). Update from the American Academy of Periodontology. *DentistryIQ*. Retirado a 28 de Junho, 2016, de <http://www.dentistryiq.com/articles/2015/08/update-from-the-american-academy-of-periodontology.html>
- Gonçalves, P. F., Klepac-Ceraj, V., Huang, H., Paster, B. J., Aukhil, I., Wallet, S. M., e Shaddox, L. M. (2013). Correlation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* detection with clinical/immunoinflammatory profile of localized aggressive periodontitis using a 16S rRNA microarray method: A cross-sectional study. *PLoS ONE*, 8(12), 1–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0085066>

- Gruner, D., Paris, S., e Schwendicke, F. (2016). Probiotics for managing caries and periodontitis : Systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*, 48, 16–25. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.03.002>
- Gurav, A. N. (2016). Management of diabolical diabetes mellitus and periodontitis nexus: Are we doing enough? *World Journal of Diabetes*, 7(4), 50. <http://doi.org/10.4239/wjd.v7.i4.50>
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P., e Curtis, M. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(10), 717–25. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2873>
- He, X., Lux, R., Kuramitsu, H. K., Anderson, M. H., e Shi, W. (2009). Achieving probiotic effects via modulating oral microbial ecology. *Advances in Dental Research*, 21, 53–56. <http://doi.org/10.1177/0895937409335626>
- Highfield, J. (2009). Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian Dental Journal*, 54 Suppl 1, S11–26. <http://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01140.x>
- Islam, S. K. M. A., Seo, M., Lee, Y., e Moon, S. (2015). Association of Periodontitis with Insulin Resistance ,  $\beta$ -Cell Function, and Impaired Fasting Glucose Before Onset of Diabetes. *Endocrine Journal*, 62(11), 981–989.
- Jivoinovici, R., Suci, I., Dimitriu, B., Perlea, P., Bartok, R., Malita, M., e Ionescu, C. (2014). Endo-periodontal lesion – endodontic approach. *Journal of Medicine and Life*, 7(4), 542–544.
- Kalsi, D. S., Chopra, J., e Sood, A. (2015). Association of lipid profile test values, type-2 diabetes mellitus, and periodontitis. *Indian Journal of Dentistry*. <http://doi.org/10.4103/0975-962X.157270>
- Karthikeyan, R., Murugan, M., Peeran, S., Al Mugarbi, M., Awidat, K., e Basheer, O. (2014). Single nucleotide polymorphisms and periodontitis. *Dentistry and Medical Research*, 2(1), 3. <http://doi.org/10.4103/2348-1471.131556>

- Katuri, K. K., Dasari, A. B., Kurapati, S., Vinnakota, N. R., Bollepalli, A. C., e Dhulipalla, R. (2016). Association of yoga practice and serum cortisol levels in chronic periodontitis patients with stress-related anxiety and depression. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 6(1), 7–14. <http://doi.org/10.4103/2231-0762.175404>
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Periasamy, S., e Jakubovics, N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(7), 471–480. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2381>
- Kowalski, J., e Gerska, R. (2014). Clinical and microbiological evaluation of biofilm-gingival interface classification in patients with generalized forms of periodontitis. *Polish Journal of Microbiology*, 63(2), 175–181.
- Krishnan, K., Chen, T., & Paster, B. J. (2016). A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Diseases*. <http://doi.org/10.1111/odi.12509>
- Kulkarni, C., e Kinane, D. F. (2014). Host response in aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 65(1), 79–91. <http://doi.org/10.1111/prd.12017>
- Kuramitsu, H. K., He, X., Lux, R., Anderson, M. H., e Shi, W. (2007). Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 71(4), 653–670. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00024-07>
- Lindhe, J. (2008). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* ( Editores Jan Lindhe e Niklaus P. Lang) (5ª Edition)
- Lodi, C. S., Oliveira, L. V., Brighenti, F. L., Delbem, A. C. B., e Martinhon, C. C. R. (2015). Effects of probiotic fermented milk on biofilms, oral microbiota, and enamel. *Brazilian Oral Research*, 29(1), 01–01. <http://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0033>

- Ma, L., Ding, Q., Feng, X., e Li, F. (2013). The protective effect of recombinant FomA-expressing *Lactobacillus acidophilus* against periodontal infection. *Inflammation*, 36(5), 1160–1170. <http://doi.org/10.1007/s10753-013-9651-x>
- Maekawa, T., e Hajishengallis, G. (2014). Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *Journal of Periodontal Research*, 49(6), 785–791. <http://doi.org/10.1111/jre.12164>
- Marquez, I. C. (2013). How Do I Manage a Patient with Periodontal Abscess? *Journal of the Canadian Dental Association*, [www.jcda.ca/article/d8](http://www.jcda.ca/article/d8)
- Meenawat, A., Govila, V., Goel, S., Verma, S., Punj, K., Srivastava, V., e Dolas, R. S. (2015). Evaluation of the effect of nicotine and metabolites on the periodontal status and the mRNA expression of interleukin-1beta in smokers with chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. <http://doi.org/10.4103/0972-124X.157879>
- Mizrahi, Y. (2014). NUG - necrotizing ulcerative gingivitis: a review. *Refuat Hapeh Vehashinayim*
- Nadkerny, P., Ravishankar, P., Pramod, V., Agarwal, L., e Bhandari, S. (2015). A comparative evaluation of the efficacy of probiotic and chlorhexidine mouthrinses on clinical inflammatory parameters of gingivitis: A randomized controlled clinical study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 19(6), 633. <http://doi.org/10.4103/0972-124X.168491>
- Nassar, P. O., Bombardelli, C. G., Walker, C. S., Neves, K. V., Tonet, K., Nishi, R. N., Bombanatti R. e Nassar, C. A. (2013). Avaliação periodontal de diferentes técnicas de escovação em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos fixos. *Dental Press Journal of Orthodontics*, 18(1), 76–80.
- Newman, M., Takei, H., Klokkevold, P., e Carranza, F. (2012). *Carranza Periodontia Clínica*. Elsevier.

- Newman, Takei, Klokkevold, e Carranza. (2015). *Carranza's Clinical Periodontology* (12<sup>a</sup> Edição). Elsevier.
- Nissen, L., Sgorbati, B., Biavati, B. e Belibasakis, G. N. (2014). Lactobacillus salivarius and L. gasseri down-regulate Aggregatibacter actinomycetemcomitans exotoxins expression. *Annals of Microbiology*, 64(2), 611–617. <http://doi.org/10.1007/s13213-013-0694-x>
- Pérez-Chaparro, P. J., Gonçalves, C., Figueiredo, L. C., Favari, M., Lobão, E., Tamashiro, N., Duarte P., e Feres, M. (2014). Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *Journal of Dental Research*, 93(9), 846–858. <http://doi.org/10.1177/0022034514542468>
- Preshaw, P. M. (2015). Detection and diagnosis of periodontal conditions amenable to prevention. *BMC Oral Health*, 15 Suppl 1(Suppl 1), S5. <http://doi.org/10.1186/1472-6831-15-S1-S5>
- Reddy, M. S., e Narendara Babu, M. (2011). How beneficial is bacterial prophylaxis to periodontal health? *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 2(2), 95–101. <http://doi.org/10.1111/j.2041-1626.2010.00034.x>
- Report, P. (2015). Interventions for the Control of Nontyphoidal Salmonella spp . in Beef and Pork, *Board of Trustees of the American Academy Periodontology*
- Roberts, F. A., e Darveau, R. P. (2015). Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: Symbiosis and dysbiosis. *Periodontology 2000*, 69(1), 18–27. <http://doi.org/10.1111/prd.12087>
- Selle, K., e Klaenhammer, T. R. (2013). Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of Lactobacillus gasseri on human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(6), 915–935. <http://doi.org/10.1111/1574-6976.12021>

- Seshima, F., Nishina, M., Namba, T., e Saito, A. (2016). Periodontal Regenerative Therapy in Patient with Chronic Periodontitis and Type 2 Diabetes Mellitus: A Case Report. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 57(2), 97–104. <http://doi.org/10.2209/tdcpublication.2015-0041>
- Shivanaikar, S., Faizuddin, M., e Bhat, K. (2016). Effect of smoking on neutrophil apoptosis in chronic periodontitis: An immunohistochemical study. *Indian Journal of Dental Research*, 6–8.
- Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., Hernández M., e Gamonal, J. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of Applied Oral Science*, 23(3), 329–55. <http://doi.org/10.1590/1678-775720140259>
- Singh, S., Sharma, P., e Shreehari, A. K. (2015). Dental Plaque Biofilm: An Invisible Terror in the Oral Cavity. *Pakistan Oral & Dental Journal*, 6(1), 422–428.
- Singh, V., Sharma, J., Babu, S., Singla, A., e Rizwanulla. (2013). Role of probiotics in health and disease: A review. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 63, 253–257.
- Singhi, S. C., e Kumar, S. (2016). Probiotics in critically ill children. *F1000 Research*, 5(0), 1–11. <http://doi.org/10.12688/f1000research.7630.1>
- Stamatova, I., e Meurman, J. H. (2009). Probiotics and periodontal disease. *Periodontology 2000*, 51(1), 141–151. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00305.x>
- Sundararajan, S., Muthukumar, S., e Rao, S. R. (2015). Relationship between depression and chronic periodontitis. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 19(3), 294–6. <http://doi.org/10.4103/0972-124X.153479>

- Suzuki, Y., Nakamura, N., Miyabe, M., Nishikawa, T., Miyajima, S., Adachi, K., ... Naruse, K. (2015). Anti-inflammatory role of glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) in periodontitis. *Journal of Diabetes Investigation*, n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/jdi.12450>
- Tanaka, H., Tanabe, N., Kawato, T., Nakai, K., Kariya, T., Matsumoto, S., ... Maeno, M. (2013). Nicotine Affects Bone Resorption and Suppresses the Expression of Cathepsin K, MMP-9 and Vacuolar-Type H<sup>+</sup>-ATPase d2 and Actin Organization in Osteoclasts. *PLoS ONE*, 8(3), 1–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0059402>
- Tekce, M., Ince, G., Gursoy, H., Dirikan Ipci, S., Cakar, G., Kadir, T., e Yilmaz, S. (2015). Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic periodontitis: A 1-year follow-up study. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(4), 363–372. <http://doi.org/10.1111/jcpe.12387>
- Terai, T., Okumura, T., Imai, S., Nakao, M., Yamaji, K., Ito, M., ... Hanada, N. (2015). Screening of probiotic candidates in human oral bacteria for the prevention of dental disease. *PLoS ONE*, 10(6), 1–20. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0128657>
- Teughels, W., Van Essche, M., Sliepen, I., e Quirynen, M. (2008). Probiotics and oral healthcare. *Periodontology 2000*, 48(1), 111–147. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2008.00254.x>
- Vijay, A., Inui, T., Dodds, M., Proctor, G., e Carpenter, G. (2015). Factors that influence the extensional rheological property of saliva. *PLoS ONE*, 10(8), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0135792>
- Villagrana, A. P., e Clavel, J. F. (2012). Antimicrobial or subantimicrobial antibiotic therapy as an adjunct to the nonsurgical periodontal treatment: a meta-analysis. *ISRN Dentistry*, 2012, 581207. <http://doi.org/10.5402/2012/581207>
- von Amann, G. P., e Cádima, C. (2008). *Estudo Nacional de Prevalência das Doenças Orais* (Vol. 1). Portugal.

- Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, 69(1), 137–143. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>
- Weichselbaum, E. (2009). Probiotics and health: A review of the evidence. *Nutrition Bulletin*, 34(4), 340–373. <http://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2009.01782.x>
- WHO. (2013). Oral Health Surveys - Basic Method. *World Health Organization*, 1.137.
- Win, W. T., Pan, Y. P., e Lin, L. (2016). Association between IL-1 $\alpha$  rs17561 and IL-1 $\beta$  rs1143634 polymorphisms and periodontitis: a meta-analysis. *Genetics and Molecular Research*, 15(1), 15017325.
- World Health Organization. (2012). Oral Health. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/>
- World Health Organization. (2015). Periodontal country profiles. Retirado a 28 de Junho, 2016, de [http://www.who.int/oral\\_health/databases/niigata/en/](http://www.who.int/oral_health/databases/niigata/en/)
- Zarco, M. F., Vess, T. J., e Ginsburg, G. S. (2012). The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Diseases*, 18(2), 109–120. <http://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01851.x>
- Zenobia, C., e Hajishengallis, G. (2015). Porphyromonas gingivalis virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence*, 6(3), 236–43. <http://doi.org/10.1080/21505594.2014.999567>
- Zia, A., Andrabi, S., Qadri, S., e Bey, A. (2015). Necrotizing periodontitis in a heavy smoker and tobacco chewer - A case report. *Singapore Dental Journal*, 36, 35–8. <http://doi.org/10.1016/j.sdj.2015.07.001>