



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES *TLR* NA DOENÇA PERIODONTAL

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para a obtenção
do grau de Mestre em Medicina Dentária.

Por: Petra Ferreira Matias

Viseu, 2024



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES TLR NA DOENÇA PERIODONTAL

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para a obtenção
do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:
Petra Ferreira Matias

Orientador: Professora Doutora Raquel Silva

Co-Orientadores: Professora Doutora Karina Mendes, Professor Doutor Tiago Marques

Viseu, 2024

Membros do Júri das Provas Públicas

Presidente: Professora Doutora Rita Noites
(Professora Auxiliar)

Arguente: Professora Doutora Ana Peixoto
(Investigadora Auxiliar)

Orientador: Professora Doutora Raquel Silva
(Professora Auxiliar)

Data das provas públicas: 18 / 07 / 2024

“Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam
um pouco de nós”.
Antoine de Saint-Exupery in “O Príncipezinho

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus avós, Alice e Manuel, pela oportunidade para que conseguisse realizar este sonho.

Dedico à minha mãe, ao Carlitos e à minha vida em forma de gente, à minha irmã, à minha avó Palmira, aos meus “segundos avós”, Ziza e Zé, todos os outros familiares, nomeadamente, primos e tios, que sempre acreditaram em mim.

Dedico também às minhas três estrelas, o meu pai, a minha bisavó Conceição e ao meu tio Chico que estarão para sempre presentes no meu coração, certamente muito orgulhosos com esta minha conquista.

Ao Diogo, que nestes últimos anos foi o meu maior apoio, o meu confidente, meu porto de abrigo.

AGRADECIMENTOS

A conclusão de um trabalho desta índole é uma conquista extraordinária, tendo envolvido uma rede de apoio e orientação. Reconhecer as contribuições daqueles que foram fundamentais no meu esforço académico é uma forma significativa de expressar a minha gratidão.

Expresso a minha profunda gratidão à Professora Doutora Raquel Silva, pela sua orientação inestimável, apoio inabalável e *feedback* construtivo em todas as etapas da realização deste trabalho.

Agradeço aos Coorientadores, Professora Doutora Karina Mendes e Professor Doutor Tiago Marques pela forma como acompanharam este projeto e me ajudaram também a levá-lo a bom porto.

Agradeço ao SalivaTec, em particular à Mónica Fernandes e à Marla Pinto, pela prestimosa ajuda nas recolhas.

À Universidade Católica Portuguesa, na pessoa de todos os agentes educativos, com quem partilhei todo um percurso de vida académica.

Um agradecimento especial à minha família e Diogo, cujo incentivo e compreensão forneceram a base para a minha trajetória académica. A sua confiança em mim alimentou a perseverança necessária para concluir este percurso formativo.

À minha amiga Carolina Pinto, obrigada por toda a força e por teres sempre as palavras certas na hora certa, obrigada por nunca me deixares desistir e estares lá para me dares força de vontade para continuar.

À Joana, a minha companheira de curso, de todas as horas em Viseu, por todos os momentos vivenciados e ter sido essencial ao longo destes anos, esperando sempre que muitos virão para caminharmos lado a lado.

Muito obrigado!

RESUMO

Introdução: A periodontite é uma das doenças orais mais predominantes que afetam a maioria da população mundial. A periodontite grave, em particular, pode levar à incapacidade devido ao comprometimento da função mastigatória e estética ou edentulismo. Assim, as estratégias de intervenção que visem a sinalização *Toll-like receptors (TLR)* e as células T/B reguladoras do sistema imunitário podem ser uma abordagem promissora para reequilibrar a resposta imunitária e aliviar a perda óssea na doença periodontal.

Objetivo: Avaliar alterações na expressão dos genes *TLR* na saliva de pacientes e validar o uso destas moléculas como biomarcadores no prognóstico e gestão dos casos clínicos de doença periodontal.

Material e métodos: Foi feita a caracterização sociodemográfica e clínica de um grupo de pacientes com doença periodontal, bem como recolha de amostras de saliva e biofilme para posterior análise molecular. Foram selecionados pacientes de acordo com o grau/estadio da doença periodontal, sendo a expressão dos *TLR* avaliada por RT-PCR.

Resultados: A população em estudo é constituída por 21 pacientes, entre os quais 52% eram mulheres e 48% homens, com prevalência da faixa etária dos 62-77 anos. Quanto ao diagnóstico, prevaleceram os pacientes com Periodontite, II, B. Foram identificadas alterações na expressão do gene *TLR2* na saliva de um grupo representativo de amostras. A análise semiquantitativa demonstrou que a expressão relativa de *TLR2* aumenta com a progressão da periodontite, embora o reduzido número de amostras não permita retirar conclusões definitivas.

Conclusão: Sugere-se a continuidade deste estudo com um número mais elevado de amostras, bem como a identificação de novos marcadores moleculares que possam auxiliar no diagnóstico precoce e no plano de tratamento ou monitorização da doença periodontal.

Palavras-chave: *Toll-like receptors*; Periodontite; Biomarcadores Moleculares; Saliva.

ABSTRACT

Introduction: Periodontitis is one of the most prevalent oral diseases affecting the majority of the world's population. Severe periodontitis, in particular, can lead to disability due to impaired masticatory and esthetic function or edentulism. Thus, intervention strategies targeting Toll-like receptors (TLR) signaling and regulatory T/B cells of the immune system may be a promising approach to rebalance the immune response and alleviate bone loss in periodontal disease.

Objective: To evaluate changes in the expression of TLR genes in the saliva of patients and validate the use of these molecules as biomarkers in the prognosis and management of clinical cases of periodontal disease.

Material and methods: The sociodemographic and clinical characterization of a group of patients with periodontal disease was carried out, as well as the collection of saliva and biofilm samples for subsequent molecular analysis. Patients were selected according to the degree/stage of periodontal disease, and TLR expression was assessed by RT-PCR.

Results: The study population consisted of 21 patients, among whom 52% were women and 48% men, with prevalence in the 62-77 age group. In terms of diagnosis, patients with Periodontitis, II, B prevailed. Alterations in the expression of the TLR2 gene were identified in the saliva of a representative group of samples. Semi-quantitative analysis showed that the relative expression of TLR2 increases with the progression of periodontitis, although the small number of samples does not allow definitive conclusions to be drawn.

Conclusion: It is suggested that this study be continued with a higher number of samples, as well as the identification of new molecular markers that can help in the early diagnosis and treatment plan or monitoring of periodontal disease.

Keywords: Toll-like receptors; Periodontitis; Molecular biomarkers; Saliva.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	26
1.1. DOENÇA PERIODONTAL.....	26
1.2. RECETORES <i>TOLL-LIKE</i> (TLRs).....	29
1.3. FATORES DE RISCO PARA A DOENÇA PERIODONTAL.....	34
1.4. DIAGNÓSTICO DE DOENÇA PERIODONTAL	35
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1. DESENHO DO ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	40
3.2. PROCEDIMENTOS DE RECOLHA DE AMOSTRAS.....	40
3.3. RECOLHA DE DADOS CLÍNICOS E SOCIODEMOGRÁFICOS	41
3.4. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES <i>TLR2</i> E <i>TLR4</i> POR RT-PCR	43
3.5. QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA <i>TLR4</i> POR ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY).....	44
4. RESULTADOS	46
4.1. CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA E CLÍNICA DA AMOSTRA	46
4.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	52
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

9. ANEXOS.....	72
Anexo 1 – Parecer da Comissão de Ética da Universidade Católica Portuguesa – Mandato 2019/2023	72
Anexo 2 – Questionário.....	73
Anexo 3 – Consentimento OralPreciseMed.....	91
Anexo 4 - Resultado do PCR de gradiente para testar a temperatura ótima dos primers.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Respostas imunitárias contribuindo diretamente para a patogénese da periodontite.....	32
Figura 2. Inflamação periodontal mediada pela resposta imune e perda óssea...	33
Figura 3. Locais de recolha das amostras de biofilme oral assinaladas com setas (imagem obtida no <i>SMART - Servier Medical ART</i>)	40
Figura 4. Periochart	41
Figura 5. Distribuição da amostra de acordo com o sexo.....	45
Figura 6. Distribuição da amostra de acordo com a idade	46
Figura 7. Distribuição da amostra de acordo com hábitos tabágicos	46
Figura 8. Patologias apresentadas pelos pacientes	47
Figura 9. Tomar medicação.....	48
Figura 10. Diagnóstico dos pacientes.....	48
Figura 11. Número de vezes que os pacientes lavam os dentes diariamente.....	49
Figura 12. Uso de fio dentário	49
Figura 13. Resultados da eletroforese em gel de agarose para os produtos de <i>RT-qPCR</i> do gene <i>TLR2</i> (temperatura de annealing de 60 °C)	52
Figura 14. Expressão relativa do gene <i>TLR2</i> nas amostras testadas	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Estadiamento e classificação da periodontite.....	26
Tabela 2. Sequência de <i>primers</i> , temperatura de fusão calculada e tamanho esperado do produto de <i>PCR</i>	42
Tabela 3. Índice de placa bacteriana, sangramento, profundidade de sondagem, idade, gênero e diagnóstico	50
Tabela 4. Diagnóstico, idade e gênero para cada amostra testada no <i>RT-PCR</i>	51

ÍNDICE DE SIGLAS E ACRÓNIMOS

AAP – American Academy of Periodontology

cDNA – DNA Complementar

DAMPs – Padrões Moleculares Associados a Danos Celulares

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dsRNA – RNA de Cadeia Dupla

EFP – European Federation of Periodontology

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

IFN γ – Interferão-gama

IL – Interleucina

LPS – Lipopolissacárido

LTA – Ácido Lipoteicóico

MMP – Metaloproteinases da Matriz

NF κ B – Fator Nuclear Kappa B

PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Agentes Patogénicos

PBMCs – Células Mononucleares Periféricas do Sangue

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PRRs – Recetores de Reconhecimento de Padrões

RGPD – Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados

RNA – Ácido Ribonucleico

RT – Transcritase Reversa

ssRNA – RNA de Cadeia Simples

TLR – Toll-like Receptors

TNF - α – Fator de Necrose Tumoral alfa

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA PERIODONTAL

A periodontite é uma das doenças orais mais predominantes que afetam a maioria da população mundial. De acordo com o *Global Burden of Disease Study*, a doença periodontal grave foi a 11ª condição mais prevalente no mundo (1). A prevalência da doença periodontal pode variar de 20% a 50% em todo o mundo (2). É uma das principais causas de perda dentária que pode comprometer a mastigação, a estética, a autoconfiança e a qualidade de vida (2). Prevê-se que a prevalência global da doença periodontal aumente nos próximos anos, pelo crescimento da população idosa e pelo aumento da retenção de dentes naturais, devido a uma redução significativa da perda de dentes na população idosa (3).

A periodontite representa um importante problema de saúde pública devido à sua elevada prevalência e morbidade associada. A periodontite grave, em particular, pode levar à incapacidade devido ao comprometimento da função mastigatória e estética ou edentulismo, é uma fonte de desigualdade social e prejudica significativamente a qualidade de vida (3). Além disso, a periodontite grave tem um impacto negativo na saúde geral e está associada a custos significativos de cuidados dentários (3).

Em 2017, a *American Academy of Periodontology* (AAP) e a *European Federation of Periodontology* (EFP) apresentaram conjuntamente a nova classificação para as doenças e as condições periodontais e peri-implantares no *workshop* mundial (4, 5). Esta classificação substituiu a classificação de doenças periodontais de Armitage de 1999, que tinha sido utilizada durante quase duas décadas (4). Este novo quadro de classificação das doenças periodontais redesenhado incluía um sistema de classificação e estadiamento multidimensional, a classificação inaugural para as doenças e condições peri-implantares e uma recategorização das várias formas de periodontite (4, 5). Assim, de acordo com o conhecimento atual da fisiopatologia na doença periodontal, podem ser identificadas três formas de periodontite: periodontite necrosante, periodontite como manifestação de doença sistémica e o que anteriormente era considerado separadamente como a forma “crónica” ou “agressiva” da doença é agora classificado em conjunto como uma nova classificação de periodontite (5). Foi dada prioridade ao estabelecimento

de definições de casos clínicos periodontais e ao fornecimento de critérios de diagnóstico para doenças periodontais e peri-implantares, como se apresenta na Tabela 1 (5).

	Gravidade da doença e complexidade da gestão			
	Estadio I: Periodontite inicial	Estadio II: Periodontite moderada	Estadio III: Periodontite grave com potencial para perda adicional de dentes	Estadio IV: Periodontite avançada com perda extensa de dentes e potencial para perda de dentição
Evidência ou risco de progressão rápida, resposta ao tratamento e efeitos na saúde sistêmica	Grau A	Fase individual e atribuição de grau		
	Grau B			
	Grau C			

Tabela 1. Estadiamento e classificação da periodontite
Fonte: Tonetti *et al.* (5)

A periodontite é considerada a sexta doença osteolítica mais prevalente nos seres humanos (6).

Patologicamente, a periodontite é definida como uma doença inflamatória causada por alterações disbióticas da microbiota subgingival ligada ao dente, o que leva a uma resposta imunitária osteolítica desregulada e, finalmente, à perda do dente (7). Neste contexto, a resposta imunitária do hospedeiro pode ser modificada por fatores genéticos e epigenéticos que remodelam a cromatina, causando a ativação ou inativação de genes que podem determinar uma suscetibilidade diferencial para o desenvolvimento de periodontite e outras comorbidades inflamatórias (7). A periodontite de estadio IV partilha as características de gravidade e complexidade da periodontite de estadio III, mas inclui as sequelas anatômicas e funcionais da perda de dentes e de ligação periodontal (alargamento e desvio dos dentes, colapso da mordida), que requerem intervenções adicionais após a conclusão do tratamento periodontal ativo (5, 8). A distinção entre a periodontite de estadio III e de estadio IV baseia-se principalmente nas sequelas comuns da perda avançada de suporte dos tecidos periodontais, que incluem: (i) perda dentária, resultando em <20 dentes remanescentes (<10 pares opostos); (ii) disfunção mastigatória; (iii) grau de mobilidade dentária ≥ 2 ; (iv) defeitos severos do rebordo

alveolar; e (v) colapso oclusal (desvio dentário, alargamento). Estas características únicas da periodontite de estadio IV requerem um tratamento de maior nível de complexidade, mas também necessitam de uma abordagem interdisciplinar para a reabilitação da dentição comprometida (8).

Uma diferença importante entre o tratamento dos estadios III e IV da periodontite é a necessidade de um paciente no estadio IV manter/restabelecer uma dentição funcional e a necessidade de um programa rigoroso de cuidados de apoio antes, durante e após a fase de reabilitação (9, 10). Foi demonstrado que os pacientes com periodontite de estadio IV, quando comparados com os de estadio I, têm um risco mais elevado de perda dentária relacionada com o periodonto durante um período de acompanhamento de 10-30 anos (rácio de risco 3,73), bem como um risco mais elevado de migração dentária patológica e outras consequências funcionais (11).

Embora certas bactérias sejam consideradas patogénicas devido à sua forte associação com a doença periodontal, também se encontram em locais saudáveis de pacientes doentes ou em locais periodontais de indivíduos saudáveis. Embora componentes ou subprodutos específicos das bactérias, tais como as enzimas (colagenase, protease e hialuronidase), as toxinas (como a leucotoxina) e os seus metabolitos (como o sulfureto de hidrogénio) possam perturbar moderadamente o tecido periodontal, os danos provocados pela interação adversa entre o biofilme subgengival e a resposta imunitária inflamatória do hospedeiro são considerados a principal causa da patogénese periodontal, com uma destruição mais substancial e persistente dos tecidos moles e duros (9, 12). Atualmente existem fortes evidências de que a periodontite é uma doença inflamatória desencadeada pela resposta imunitária do hospedeiro aos microrganismos associados aos biofilmes periodontais, ou aos seus subprodutos, como o lipopolissacárido (LPS) e os ácidos lipoprotéicos. Este desequilíbrio entre as respostas celulares pró-inflamatórias e anti-inflamatórias do hospedeiro é considerado um elemento-chave na patogénese da doença e no dano tecidular (8, 9).

As alterações e a distribuição dos linfócitos T/B parecem ser um fator determinante do desfecho da doença periodontal, uma vez que as atividades funcionais destas células não só moldam o padrão global da resposta imunitária, como podem regular diretamente o equilíbrio ósteo-imunológico. Assim, as

estratégias de intervenção que visem a sinalização *TLR* (*Toll-like receptor*) e as células T/B reguladoras do sistema imunitário podem ser uma abordagem promissora para reequilibrar a resposta imunitária e aliviar a perda óssea na doença periodontal (6, 7).

Vários estudos identificaram espécies microbianas que estão fortemente associadas ao início e à progressão da periodontite, tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* e *Actinomyces viscosus* (8).

1.2. RECETORES TOLL-LIKE (TLRs)

Os *Toll-like receptors* (*TLR*) são parte integrante da resposta imune inata. Ao reconhecerem padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMPs) ou danos celulares (DAMPs), estas proteínas desencadeiam uma resposta inflamatória (1). Estão envolvidos numa variedade de doenças graves, incluindo cancro, pelo que são considerados alvos potenciais para o desenvolvimento de novas terapias. Os *TLR* são ativos como homo ou heterodímeros (13, 14, 15). Os recetores *TLR* estão ligados à membrana e desencadeiam respostas imunitárias inatas após o reconhecimento de uma grande variedade de compostos derivados de agentes patogénicos. Apesar da vasta gama de ligandos reconhecidos pelos *TLR*, os recetores partilham um quadro estrutural comum nos seus domínios extracelulares de ligação ao ligando. Todos estes domínios adotam estruturas em forma de ferradura construídas a partir de motivos repetidos ricos em leucina. Tipicamente, após a ligação do ligando, dois domínios extracelulares formam um dímero em forma de “m” que envolvem a molécula do ligando, aproximando os domínios transmembranar e citoplasmático e desencadeando uma cascata de sinalização a jusante. Embora a dimerização induzida pelo ligando destes recetores tenha muitas características comuns, a natureza das interações dos domínios extracelulares dos *TLR* com os seus ligandos varia acentuadamente entre os diferentes parálogos dos *TLR* (1, 16).

Os *TLR* estão localizados nas membranas das superfícies celulares ou dos endossomas e respondem a uma variedade de padrões moleculares associados a

agentes patogénicos, incluindo lipopolissacarídeos (*TLR4*), lipopeptídeos (*TLR2* associado a *TLR1* ou *TLR6*), flagelina bacteriana (*TLR5*), dsRNA (RNA de cadeia dupla) viral (*TLR3*), ssRNA (RNA de cadeia simples) viral ou bacteriano (*TLRs 7 e 8*) e DNA não metilado rico em CpG (*TLR9*), entre outros (17).

Vários estudos demonstram que as respostas imunes e inflamatórias iniciais do hospedeiro na doença periodontal são orquestradas por queratinócitos e fibroblastos do tecido conjuntivo periodontal (5, 6). As células epiteliais e os fibroblastos gengivais interagem diretamente com os microrganismos ou os seus subprodutos, geram e segregam sinais moleculares para desencadear a inflamação e atrair as células imunitárias. As células hospedeiras reconhecem os microrganismos através da interação dos recetores de reconhecimento de padrões (PRRs), que são constitutivamente expressos na membrana celular das células hospedeiras, com os padrões moleculares ou PAMPs, apresentados pelos microrganismos. Estes PAMPs podem ser moléculas de superfície celular que estão preferencialmente relacionadas com os agentes patogénicos e não estão presentes nas células hospedeiras, incluindo o lipopolissacárido (LPS) (o principal componente das paredes celulares das bactérias Gram-negativas) e o ácido lipoteicóico (LTA) (o principal componente das paredes celulares das bactérias Gram-positivas) (17, 18). O modelo de um recetor PRR ligado à membrana é a família dos recetores do tipo Toll (*TLR*), considerados a ponte crítica que liga a imunidade inata e adaptativa (6, 7). Os *TLR* podem reconhecer os agentes patogénicos periodontais e regular a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro na doença periodontal (7). Até à data, foram identificados dez *TLR* (*TLR1* a *TLR10*) em humanos. Cada *TLR* está localizado num compartimento específico da célula e pode detetar diferentes PAMPs. Foi demonstrado que as células T e B expressam vários *TLR* (como os *TLR 1, 2, 4 e 9*) e respondem aos ligantes dos *TLR*. O LPS é um ligante potente para o *TLR4*. As lipoproteínas produzidas por bactérias periodontais e o LPS de *P. gingivalis* podem ser reconhecidos como ligandos para *TLR2* (18). Um estudo mostrou que a *P. gingivalis* pode ativar ambas as vias *TLR2* e *TLR4*, resultando na produção excessiva de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em monócitos, entre outros efeitos (19, 20). Sabe-se que o *TLR9* é ativado por ácidos nucleicos microbianos não metilados (oligodeoxinucleótidos CpG), que podem levar a inflamação periodontal e perda óssea. A estimulação por diferentes tipos de

bactérias no biofilme periodontal pode induzir a expressão de diferentes *TLR*. A ligação de moléculas derivadas de agentes patogénicos aos *TLR* leva à dimerização dos *TLR* e à subsequente ativação das vias de sinalização a jusante associadas à inflamação e à osteoclastogénese (19, 20, 21).

A dimerização do *TLR* desencadeia o recrutamento de várias proteínas cinases na extremidade citoplasmática do recetor e a via inflamatória clássica é ativada, levando à regulação positiva de fatores de transcrição pró-inflamatórios (como NFκB e AP-1). São produzidas várias moléculas pró-inflamatórias, como a prostaglandina E-2 e o leucotrieno A-4. Ao mesmo tempo, o reconhecimento pelos *TLR* de ligantes microbianos leva à secreção de importantes mediadores moleculares da inflamação, incluindo citocinas inflamatórias (como TNF-α e IL-1β) e quimiocinas (como CXCL8/IL-8, CCL2, CCL3 e CCL5) (22), que promovem a migração e infiltração de células inflamatórias, como células dendríticas, macrófagos e células T e B, em tecidos periodontais doentes (22, 23). Recentemente, uma revisão de estudos clínicos humanos *in vitro* e *in vivo* relatou uma correlação entre IFNγ no fluido crevicular e periodontite, mediando potencialmente a modulação da osteoclastogénese (22, 23, 24). Durante esses processos, a infiltração de um grande número de células inflamatórias é alcançada pela degradação da matriz extravascular ao redor dos vasos sanguíneos, por enzimas como as Metaloproteinases da Matriz (MMP). Sob a influência de um grande número de sinais inflamatórios, os fibroblastos gengivais e os fibroblastos do ligamento periodontal destroem os componentes fibrosos da matriz extracelular do tecido periodontal, aumentando a produção local e a atividade das MMP, levando à destruição dos tecidos moles periodontais (23).

Na fase inicial de uma infeção, o sistema imunitário inato gera uma resposta inflamatória rápida que bloqueia o crescimento e a disseminação do agente infeccioso. Esta resposta é seguida, nos vertebrados, pelo desenvolvimento de uma resposta imunitária adquirida, na qual recetores de células B e T altamente específicos reconhecem o agente patogénico e induzem respostas que levam à sua eliminação (25). Os recetores de antígenos do sistema imunitário adquirido estão bem caracterizados. São constituídos por muitas moléculas estruturalmente semelhantes com diferentes especificidades de ligação criadas por rearranjos somáticos e mutações nas regiões do sítio de ligação dos domínios variáveis dos

recetores de células B e T (26). Em contrapartida, os recetores do sistema imunitário inato foram seleccionados evolutivamente para reconhecer compostos derivados de agentes patogénicos que são essenciais para a sobrevivência do agente patogénico ou moléculas endógenas que são libertadas pelo hospedeiro em resposta à infeção (27).

A periodontite é iniciada pela microbiota periodontal derivada da formação do biofilme. As alterações disbióticas microbianas no biofilme desencadeiam as respostas imunitárias e inflamatórias do hospedeiro, que podem ser benéficas para a proteção do hospedeiro contra a infeção ou prejudiciais para o hospedeiro, causando a destruição dos tecidos (21, 22). Durante este processo, o reconhecimento de PAMPs pelos PRRs do hospedeiro, como por exemplo os recetores *TLR*, desempenha um papel essencial na interação hospedeiro-micróbio e nas subsequentes respostas inatas e adaptativas. Se persistente, a interação adversa desencadeada pela resposta imunitária do hospedeiro aos microrganismos associados aos biofilmes periodontais é uma causa direta da inflamação periodontal e da perda óssea (7, 22). Um grande número de linfócitos T e B são infiltrados nos tecidos gengivais doentes, os quais podem secretar mediadores inflamatórios e ativar as vias osteolíticas, promovendo a inflamação periodontal e a reabsorção óssea (6, 7).

De um modo geral, as evidências têm demonstrado que mecanismos epigenéticos conservados contribuem para a manutenção da inflamação e de estados fisiológicos/aberrantes relacionados com alterações da expressão génica (23). De acordo com este ponto de vista, a metilação do DNA é fundamental para a expressão genética diferencial, uma vez que as modificações epigenéticas que variam entre diferentes tipos de células promovem alterações na expressão genética, afetando o seu fenótipo e comportamento durante os estados de doença/saúde (24, 25). Assim, a identificação de perfis epigenéticos e a forma como estes determinam a expressão de genes relacionados com a resposta imunitária periodontal podem ser úteis para identificar potenciais marcadores de risco do início e progressão da periodontite, e fatores relacionados com as suas comorbilidades (20, 24, 25).

Devido ao seu papel essencial como sensores de DAMP e PAMP, a sinalização dos *TLR* também contribui de forma importante para várias doenças

sistêmicas, incluindo doenças cardiovasculares e diabetes (28).

As respostas imunitárias contribuem diretamente para a patogênese da periodontite. É necessário alcançar um equilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatórias para manter a homeostase dos tecidos. Se o subtipo de células pró-inflamatórias persistir predominantemente, há uma tendência para a destruição dos tecidos e para a reabsorção óssea. Pelo contrário, se as linhagens anti-inflamatórias e pró-resolutivas se desenvolverem predominantemente de forma atempada, a inflamação será controlada e os tecidos serão reparados ou regenerados (figura 1).

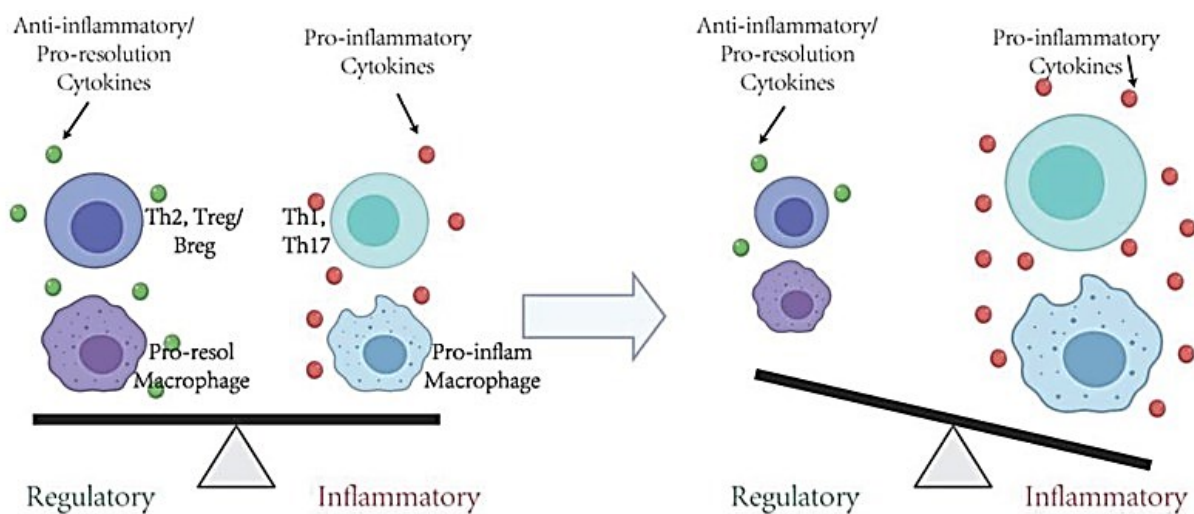


Figura 1. Respostas imunitárias contribuindo diretamente para a patogênese da periodontite. Adaptado de Gu and Han, 2020 (21).

Na doença periodontal, as células Th1 e Th17 ativadas produzem citocinas pró-inflamatórias que contribuem para os danos nos tecidos. Tanto as células T como as células B ativadas produzem ligantes do recetor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), que leva à ativação dos osteoclastos e à reabsorção do osso alveolar. A ativação e expansão das células B10 promovem a secreção de IL-10 e promovem a ativação das células Treg CD4+FOXP3+, inibem as células Th1/Th17 e a ativação das células T/B RANKL+, o que inibe a inflamação e a produção de RANKL, acabando por atenuar a reabsorção óssea periodontal (Figura 2).

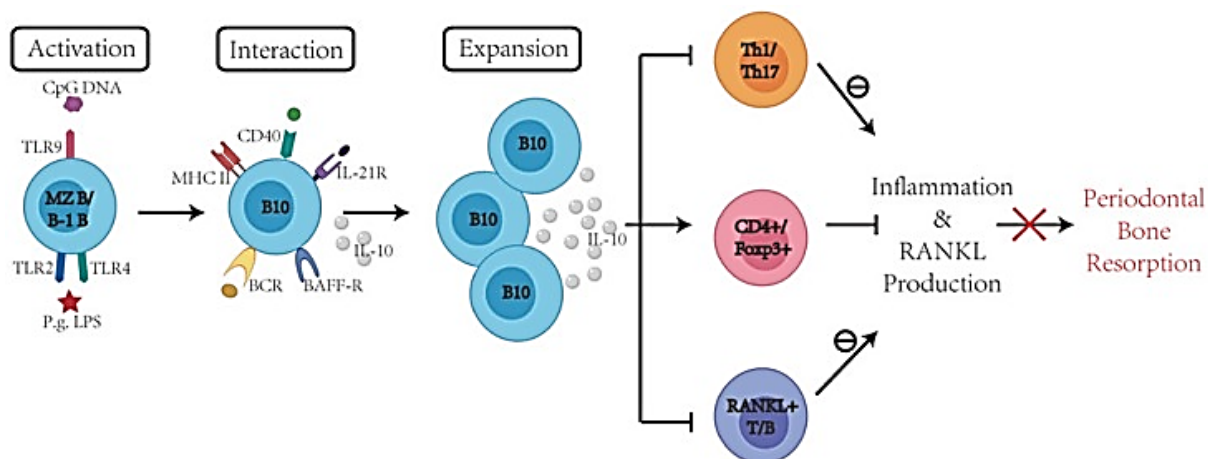


Figura 2. Inflamação periodontal mediada pela resposta imune e perda óssea. Adaptado de Gu and Han, 2020 (21)

1.3. FATORES DE RISCO PARA A DOENÇA PERIODONTAL

Os fatores de risco desempenham um papel importante na resposta de um indivíduo à infecção periodontal. A identificação destes fatores de risco ajuda a orientar os pacientes para a prevenção e o tratamento, sendo a modificação dos fatores de risco fundamental para o controlo da doença periodontal (29, 30). Mudanças na compreensão da prevalência da doença periodontal e avanços na metodologia científica e na análise estatística nas últimas décadas permitiram a identificação de vários fatores de risco sistémicos importantes para a doença periodontal (31).

A análise dos fatores de risco e a capacidade de ajustar estatisticamente e estratificar as populações para eliminar os efeitos dos fatores de confusão permitiram a identificação de fatores de risco independentes. Estes fatores de risco independentes, mas modificáveis, para a doença periodontal incluem fatores de estilo de vida, como o tabagismo e o consumo de álcool. Também incluem doenças e condições como a diabetes *mellitus*, a obesidade, a síndrome metabólica, a osteoporose e uma dieta pobre em cálcio e vitamina D. Estes fatores de risco são modificáveis e a sua gestão é uma componente importante dos cuidados de muitos pacientes com periodontite (31, 25). A corroborar, Relvas *et al.* (25) referem que a doença periodontal está associada a outras condições sistémicas comuns, tais como a diabetes, as doenças cardiovasculares, resultados adversos na gravidez, artrite reumatoide e doença pulmonar obstrutiva crónica.

Os fatores genéticos também desempenham um papel na doença periodontal e permitem direcionar os indivíduos para a prevenção e detecção precoce. No seu estudo, Relvas *et al.* (25) avaliaram a prevalência, a extensão e a gravidade das doenças periodontais e os seus fatores de risco, de acordo com a mais recente classificação periodontal, numa população adulta do Norte de Portugal. De um total de 941 pacientes incluídos, 457 (48,6%) tinham periodontite, 253 (26,9%) tinham gengivite e os restantes 231 (24,5%) eram pacientes saudáveis. A prevalência de periodontite severa no estágio III foi de 51,2%, mais prevalente. A gengivite foi mais prevalente no sexo feminino e na faixa etária de 31-40 anos; em ambas as doenças. Este estudo revelou uma elevada prevalência de periodontite. O aumento da idade, a falta de escovagem dos dentes e o uso do fio dentário foram identificados como potenciais fatores de risco para a periodontite na população portuguesa investigada.

1.4. DIAGNÓSTICO DE DOENÇA PERIODONTAL

A progressão da periodontite é frequentemente caracterizada por fases irregulares de aumento de atividade e remissão latente. Os métodos tradicionais de avaliação clínica periodontal, como a profundidade de sondagem da bolsa, sangramento à sondagem, nível de inserção clínica e avaliação radiológica do volume ósseo alveolar, são amplamente utilizados e documentados (31). Todavia, o fenótipo biológico do paciente não é adequadamente refletido por tais métodos de avaliação clínica e a resposta do hospedeiro às bactérias periodontais e a subsequente carga inflamatória, ou seja, a influência do fenótipo biológico, podem determinar em grande parte a progressão da periodontite. Além disso, um diagnóstico precoce pode levar a um tratamento mais bem-sucedido (32). Na tentativa de redesenhar o quadro da doença periodontal, a nova classificação periodontal inclui estadiamento multidimensional e parâmetros do sistema de classificação, o que permite avaliar parcialmente o risco periodontal futuro (32). Embora os novos fatores de risco de classificação, ou seja, tabagismo e a diabetes, sejam incluídos para prever a probabilidade de futura rutura periodontal, ainda não são capazes de determinar o momento exato da manifestação da doença. Assim, adicionar marcadores mais robustos, incluindo biomarcadores moleculares poderá melhorar a identificação de períodos ativos de periodontite, monitorizar a progressão

da doença e evitar a consequente má gestão do tratamento periodontal (30).

Neste âmbito refere-se que o periodontograma é o exame que avalia o estado periodontal do paciente, através do registo da profundidade de sondagem e o nível de inserção, em seis locais por dente ou por implante em toda a dentição, de forma precisa. Avalia também a mobilidade dentária, lesões de furca, entre outros (33). Este exame clínico é a melhor maneira de descobrir a diferença entre pacientes periodontalmente saudáveis e aqueles com doença periodontal. Pode considerar-se uma gengiva saudável quando esta se apresenta com bolsas que geralmente têm 2 a 3 mm; acima de 5 mm significa que o osso que sustenta o dente está a ser degradado pela doença periodontal (33).

O exame periodontal inicial e a sondagem podem ser bastante traumáticos para pacientes nos quais há presença de doença periodontal significativa. Tecidos moles inflamados e inchados e dentes com bolsas periodontais profundas serão extremamente sensíveis durante este exame. Por este motivo, a utilização de marcadores moleculares, particularmente de amostras recolhidas de forma não invasiva, como a saliva, podem ser bastante úteis para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes. Estes biomarcadores permitem a obtenção de informação mais precisa relativamente à progressão da doença e de forma mais confortável para o paciente.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho consistem em identificar alterações na expressão dos genes *TLR* na saliva de pacientes e validar o uso destas moléculas como biomarcadores no prognóstico e gestão dos casos clínicos de doença periodontal. Na medicina dentária, estes genes podem tornar-se cruciais para um diagnóstico mais precoce e sustentado, pelo seu papel potencial no desenvolvimento e progressão da doença periodontal. Por conseguinte, poderá haver uma evolução nesta área de forma a individualizar os tratamentos para cada paciente, desenvolver novos tratamentos, assumindo um papel mais preventivo e menos interventivo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DESENHO DO ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo retrospectivo observacional descritivo engloba-se no projeto com parecer favorável número 157 da Comissão de Ética, “Estratégias moleculares imunológicas em doenças inflamatórias: a ponte para a Medicina de Precisão (*OralPreciseMed*)” (Anexo 1). Os dados clínicos e sociodemográficos foram recolhidos através de um questionário (Anexo 2) e exclusivamente para uso da equipa de investigação, garantindo-se a confidencialidade de acordo com as normas do RGPD em vigor. Todos os participantes assinaram o consentimento informado, esclarecido e livre para participação em estudos de investigação (de acordo com a Declaração de Helsínquia e a Convenção de Oviedo).

Para análise molecular, foram selecionados grupos de pacientes, de acordo com o grau/estadio da doença periodontal.

3.1.1 População do estudo

A população do estudo é constituída por 21 pacientes, tendo sido elegíveis os que cumpriram os seguintes critérios de inclusão: população adulta (≥ 18 anos). Como critérios de exclusão: se já tivesse bochechado com colutório de clorexidina assim que chegou à consulta, o que comprometia a recolha de amostra biológica.

3.2. PROCEDIMENTOS DE RECOLHA DE AMOSTRAS

Aos participantes do estudo foram recolhidas amostras de saliva e biofilme. O kit de recolha inclui: Falcon de 50 ml; Eppendorf com solução PBS (tampão fosfato salino); palitos esterilizados.

As amostras de saliva foram recolhidas pelo método de “drooling”. O utente expeliu (uma ou mais vezes) a saliva para um tubo tipo Falcon de 50 ml até perfazer aproximadamente 2 ml. Após a recolha de 2 ml de saliva, as amostras foram

imediatamente colocadas em gelo até ao seu processamento no laboratório Salivatec. As amostras de biofilme foram recolhidas por “raspagem” da placa dentária (biofilme oral) em zonas pré-definidas da cavidade oral do paciente como indicado na figura 3:

- espaço interproximal entre os dentes 31 e 41, por lingual;
- espaço interproximal entre os dentes 11 e 21, por vestibular;
- espaço interproximal entre os dentes 15 e 16 por vestibular;
- espaço interproximal entre os dentes 35 e 36 por lingual;
- superfícies oclusais dos dentes 16 e 36.

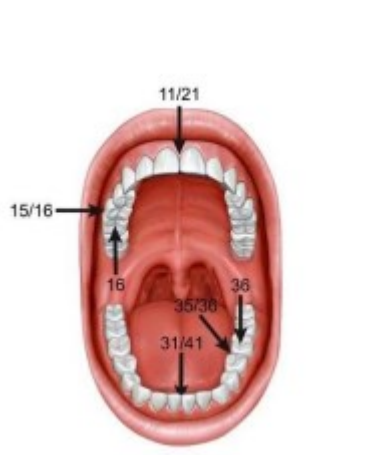


Figura 3. Locais de recolha das amostras de biofilme oral assinaladas com setas (imagem obtida no SMART - Servier Medical ART).

As amostras de saliva e de biofilme foram divididas em alíquotas e armazenadas a -80°C até à análise molecular.

3.3 RECOLHA DE DADOS CLÍNICOS E SOCIODEMOGRÁFICOS

Para além do Periochart, a recolha dos dados sociodemográficos foi realizada através de um questionário na Plataforma *Qualtrics* (Anexo2).

O exame clínico inclui ainda o Periochart.

PERIODONTAL CHART

Date

Patient Last Name

First Name

Date Of Birth

Initial Exam

Reevaluation

Clinician

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Mobility	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Implant																
Furcation																
Bleeding on Probing																
Plaque																
Gingival Margin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Probing Depth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Buccal

Buccal

Palatal

Palatal

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Gingival Margin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Probing Depth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Plaque																
Bleeding on Probing																
Furcation																
Note																

Mean Probing Depth = 0 mm Mean Attachment Level = 0 mm % Plaque % Bleeding on Probing

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Note																
Furcation																
Bleeding on Probing																
Plaque																
Gingival Margin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Probing Depth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lingual

Lingual

Buccal

Buccal

	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Gingival Margin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Probing Depth	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Plaque																
Bleeding on Probing																
Furcation																
Implant																
Mobility	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

www.periodontalchartonline.com

Copyright © 2013 by www.periodontalchartonline.com

Figura 4. Periochart

Fonte: <https://www.periodontalchart-online.com/uk/>

3.4 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES *TLR2* E *TLR4* POR RT-PCR

A quantificação relativa da expressão genética por RT-PCR foi realizada pelo laboratório SalivaTec e envolveu quatro etapas principais: extração de RNA, síntese de cDNA, RT-PCR e eletroforese em gel de agarose. Foram feitos vários testes para ambos os *TLRs*, incluindo diferentes pares de *primers* e temperaturas de *annealing*, resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência de *primers*, temperatura de fusão calculada e tamanho esperado do produto de *PCR*

Primers	Primer's sequence	Melting temperature	Expected Product size
TLR-2	F: 5'- TCGGTGTCGGAATGTCACAG -3' R: 5'- AGTCCCCTTATGAAGACAC -3'	57.3–60°C	295bp
TLR-4	F: 5'- TTCCTCTCTGCGTGAGAC -3' R: 5'- TGTCTGGATTTACACCTGG -3'	57.4–58.3°C	348bp;228bp
GAPDH	F: 5'- GGTCGGAGTCAACGGATTTGG -3' R: 5'- ACGGTGCCATGGAATTTGCC -3'	60.5C–63.2°C	165bp

3.4.1 Extração de RNA a partir de amostras de saliva

A extração de RNA a partir das amostras de saliva de pacientes em diferentes estádios da doença foi realizada utilizando um método desenvolvido pelo laboratório SalivaTec, o qual envolve um primeiro passo de lise alcalina e posterior purificação do RNA através do kit comercial Zymo Quick-RNA™ miniprep kit (R1054, Zymo Research). De salientar que todas as etapas do protocolo foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração e rácios de pureza (A260/A280; A260/A230) das amostras de RNA foram determinados utilizando a μ DropPlate (Thermo Scientific) e o leitor de microplacas Varioskan™ Lux para leitura das respetivas absorvâncias.

3.4.2 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada através de transcrição reversa do RNA extraído na etapa anterior, com recurso ao kit comercial NZY First Strand cDNA Synthesis kit, separate oligos (MB17001, NZYTech), de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.3 Análise de expressão genética por RT-PCR

As amostras de cDNA obtidas foram utilizadas na reação de RT-PCR. Resumidamente, para quantificação relativa do gene *TLR2*, *TLR4* e do gene controlo *GAPDH* foi utilizada a NZYSpeedy qPCR Green Master Mix 2x (MB22401, NZYTech) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, a presença de produtos de RT-PCR específicos para cada um dos genes em estudo foi confirmada por eletroforese em gel de agarose. A intensidade das bandas de DNA no gel de agarose para o gene de interesse foi utilizada para a quantificação relativa da expressão genética, a qual foi normalizada com a intensidade da banda de DNA do gene controlo *GAPDH*.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA *TLR4* POR ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Para quantificação da forma solúvel da proteína *TLR4* nas amostras de saliva de pacientes com saúde periodontal ou doença periodontal, foi utilizado o *Human TLR-4 ELISA Kit* (EH460RB, ThermoFisher Scientific™), de acordo com as instruções do fabricante.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA E CLÍNICA DA AMOSTRA

A amostra é constituída por 21 pacientes, entre os quais 52% são mulheres e 48% homens (figura 5).

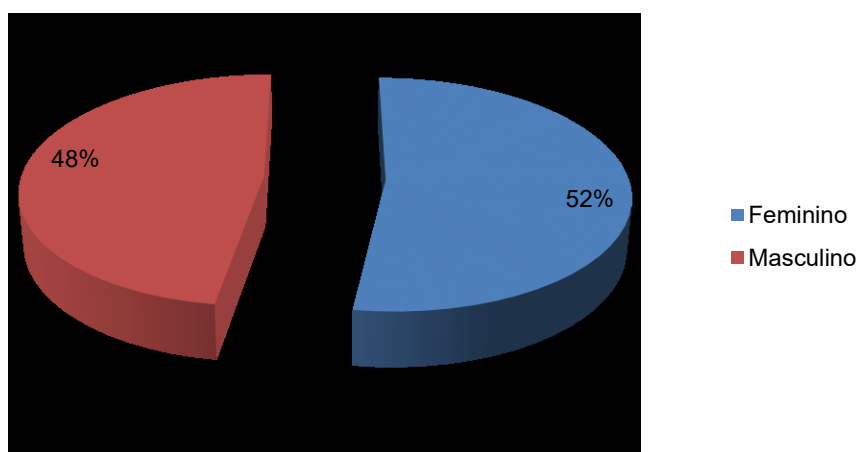


Figura 5. Distribuição da amostra de acordo com o sexo

As idades dos pacientes variam entre um mínimo de 21 anos e um máximo de 77 anos, com prevalência dos que possuem idades compreendidas entre os 62-77 anos (52%), seguindo-se os que se situam no grupo etário dos 21-34 anos e 35-45 anos, ambos com igual representatividade (24%, respetivamente (figura 6).

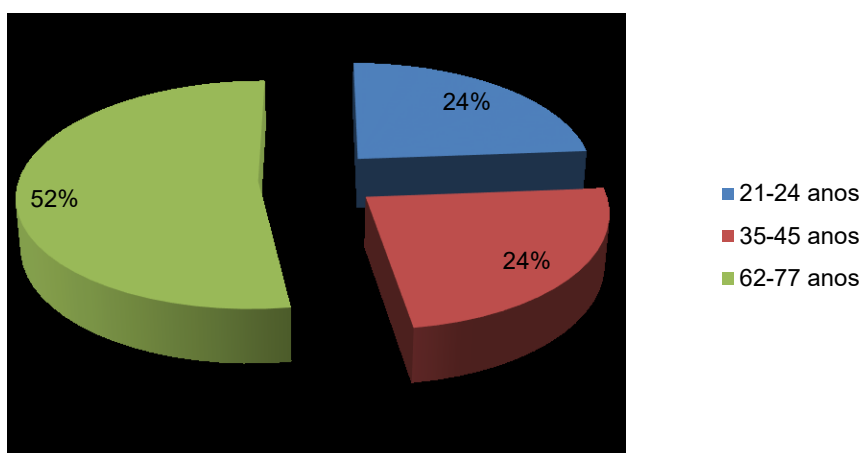


Figura 6. Distribuição da amostra de acordo com a idade

Relativamente aos fatores de risco associados à doença periodontal, na amostra em estudo, 38% dos pacientes não têm hábitos tabágicos, 33% são fumadores e 29% são ex-fumadores (figura 7).

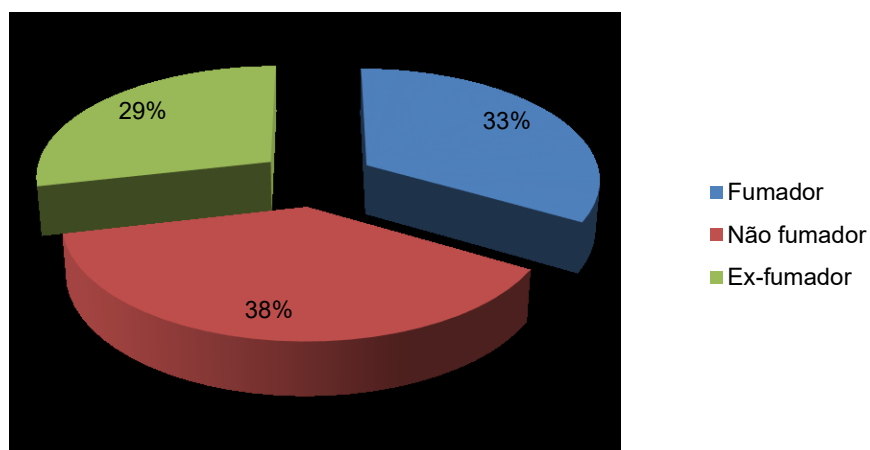


Figura 7. Distribuição da amostra de acordo com hábitos tabágicos

Maioritariamente, os pacientes possuem patologias (71%), entre os quais 30% apresentam fatores de risco cardiovasculares (hipertensão arterial e colesterol elevado), 15% apresentam patologia respiratória (sinusite, bronquite asmática) e, com igual representatividade, pacientes com doenças alérgicas (pólen e alimentar), diabetes e patologia cardiovascular (10%). Apenas seis pacientes não possuem outras patologias (figura 8).

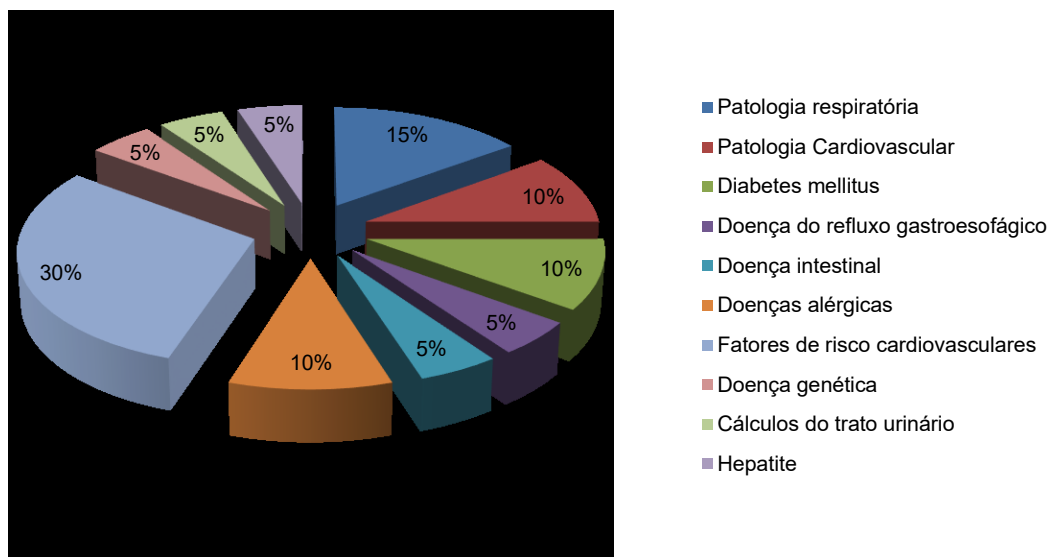


Figura 8. Patologias apresentadas pelos pacientes

Prevaecem os pacientes que não tomam medicação (73%), com apenas três (14%) a referirem toma de medicação (antidepressivos, anticoncepcional, diuréticos, antiagregante plaquetário, anti-hiperglicémico, anti-histamínico, protetor gástrico, anticoagulante, medicação para doença pulmonar obstrutiva crónica, colesterol e redução da frequência cardíaca), com alguns deles polimedicados (figura 9).

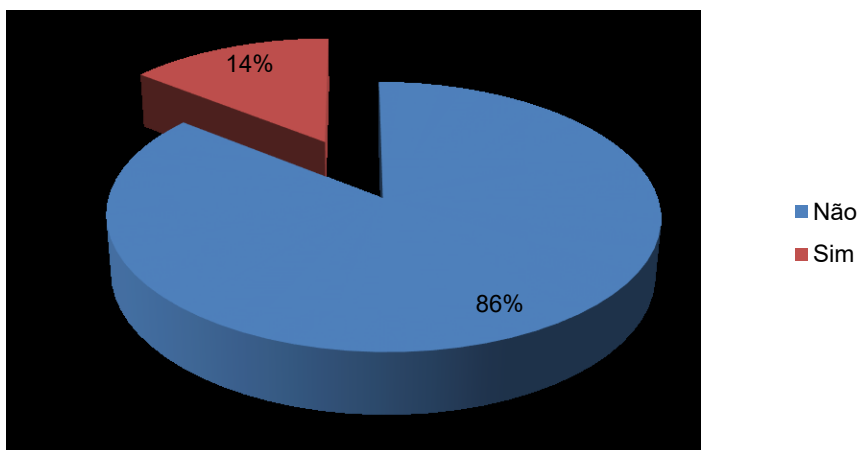


Figura 9. Tomar medicação

Relativamente ao diagnóstico de doença periodontal, prevalecem os pacientes com Periodontite, II, B (n=7; 33%), seguindo-se os que apresentam Periodonto Saudável (n=4; 19%). Três pacientes apresentam gengivite (14%), 2 deles com gengivite induzida por placa, e outros três Periodontite, I, B (n=3; 14%); 2 pacientes apresentam Periodontite, III, B (10%) e, com igual representatividade (n=1, 5%, respetivamente) Periodontite, III, C e Periodontite, I, C (figura 10).

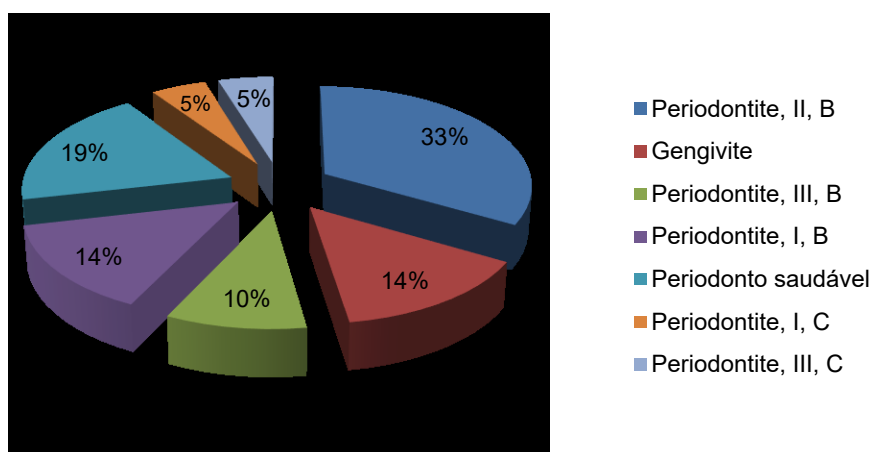


Figura 10. Diagnóstico dos pacientes

4.2. HÁBITOS DE HIGIENE

Todos os pacientes usam escova dentária, com prevalência dos que lavam os dentes 2 vezes por dia (52%), seguindo-se os que o fazem 3 vezes por dia e 1 vez por dia, ambos com igual percentagem (24%, respetivamente) (figura 11).

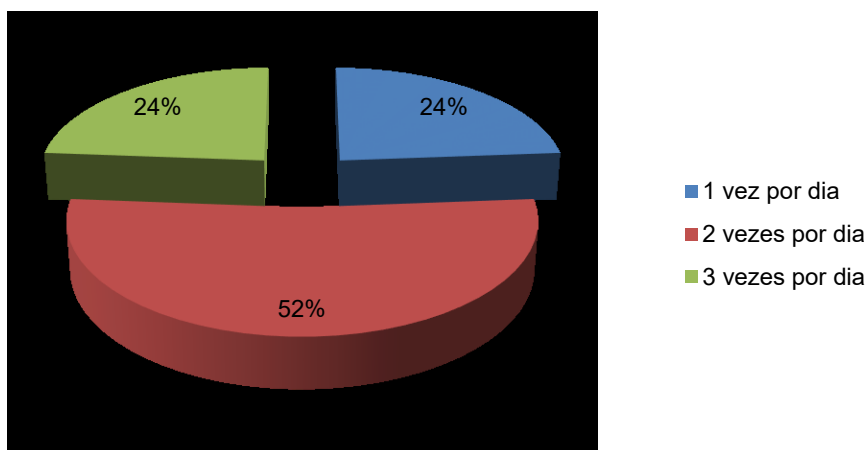


Figura 11. Número de vezes que os pacientes lavam os dentes diariamente

Prevalecem os pacientes que não usam fio dentário (57%), comparando com 43% que o usam, entre os quais 29% utilizam-no às vezes e apenas 14% diariamente (figura 12).

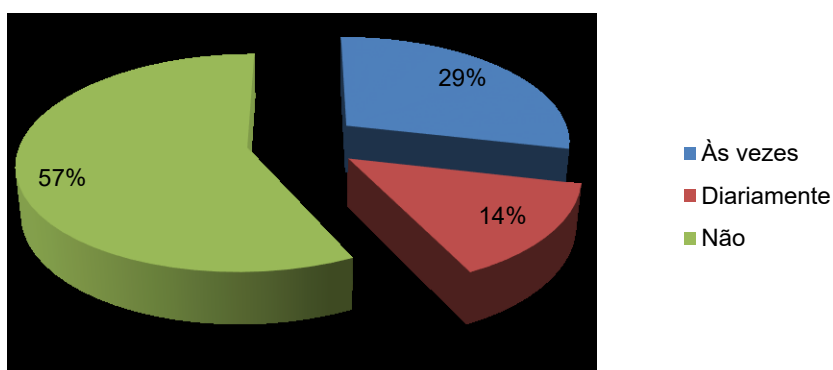


Figura 12. Uso de fio dentário

No que se refere ao índice de placa bacteriana, verifica-se um mínimo de 10% e um máximo de 64% (tabela 3).

Tabela 3. Índice de placa bacteriana, sangramento, profundidade de sondagem, idade, género e diagnóstico

Índice de placa bacteriana	Sangramento	Profundidade de Sondagem	Idade	Género	Diagnóstico
50%	15%	3,2mm	45	F	Periodontite, II, B
16%	23%	1,8mm	68	M	Periodontite, III, B
55%	75%	n.d	n.d	n.d	n.d
37%	75%	n.d	40	F	Periodontite, III, B
60%	10%	3,3mm	61	M	Periodontite, III, B
15%	12%	2,7mm	64	M	Periodontite, II, B
12%	5%	2,4mm	53	F	Periodontite, II, B
44%	19%	3 mm	26	F	Periodontite, I, B
43%	3%	0,9mm	24	M	Periodonto Saudável
24%	19%	2,2mm	58	M	Periodontite, I, B
10%	0%	1,2mm	22	F	Periodonto Saudável
23%	4%	3 mm	35	F	Gengivite
32%	2%	1,7mm	21	F	Periodonto Saudável
23%	10%	3,3mm	45	F	Periodontite, II, B
42%	2%	1,4mm	56	F	Periodontite, I, B
16%	24%	n.d	77	F	n.d
71%	53%	2,7mm	36	M	Gengivite induzida por placa
37%	n.d	2,9mm	62	M	Periodontite, II, B
19%	15%	n.d	n.d	n.d	n.d
64%	n.d	1,7mm	41	F	n.d
33%	16%	3,3mm	55	M	Periodontite, II, B

4.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Para avaliar a expressão dos genes *TLR2* e *TLR4* na saliva de pacientes com doença periodontal, foi selecionado um grupo de amostras representativo dos estádios II/III/IV (tabela 4). Desta forma, foram otimizadas as condições do RT-PCR, nomeadamente, a temperatura de annealing dos primers, através de vários PCRs de gradiente, onde foram testadas as temperaturas de 55°C, 57°C, 59°C (dados não apresentados), 60°C, 63°C e 66°C (Anexo 4).

Tabela 4. Diagnóstico, idade e género para cada amostra testada no RT-PCR.

Amostra	Diagnóstico	Idade	Género
33399	Periodontite, estágio II, grau B	30	Feminino
31582	Periodontite, estágio II, grau B	82	Feminino
32737	Periodontite, estágio IV, grau B	54	Masculino
21286	Periodontite, estágio III, grau B	61	Masculino
20955	Periodontite, estágio III, grau B	67	Masculino
32367	Periodontite, estágio II, grau B	67	Feminino

O gene *TLR4* não amplificou, em nenhuma das temperaturas testadas. Para a análise das amostras, foi selecionada a temperatura de 60°C, uma vez que apresenta apenas um fragmento e com o tamanho esperado correspondente ao *TLR2*, confirmado por sequenciação (dados não apresentados). Os resultados estão indicados na figura 13.

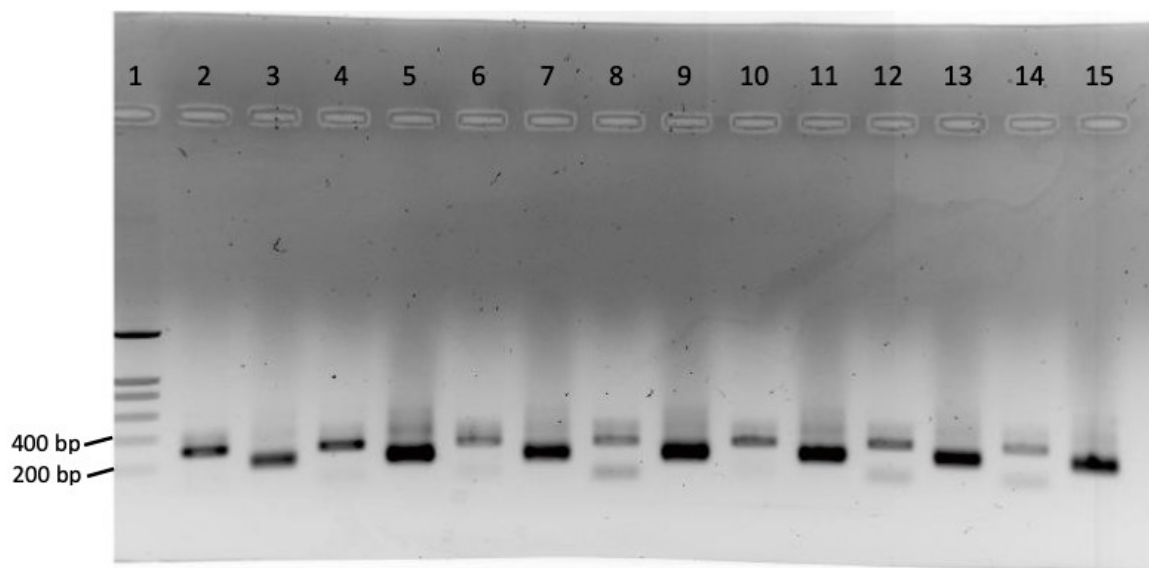


Figura 13. Resultados da eletroforese em gel de agarose para os produtos de RT-qPCR do gene *TLR2* (temperatura de annealing de 60 °C). O poço 1 contém marcador de peso molecular. Os poços pares correspondem ao fragmento amplificado do gene *TLR2* e os poços ímpares correspondem ao fragmento amplificado do gene *GAPDH*, respectivamente, das amostras 20955 (2-3), 21286 (4-5), 31582 (6-9, em duplicado), 33399 (10-11), 32737 (12-13) e 32367 (14-15). O tamanho de banda esperado para o *TLR2* é 295 pb, enquanto para o *GAPDH* é 165 pb.

Para quantificar a expressão do gene *TLR2* nas amostras, o valor médio da intensidade das bandas para o *TLR2* foi dividido pelo valor médio da intensidade das bandas correspondentes ao *GAPDH* (figura 14).

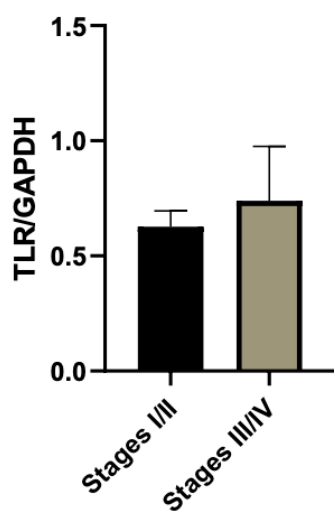


Figura 14. Expressão relativa do gene *TLR2* nas amostras testadas. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão.

Esta análise semiquantitativa sugere que a expressão relativa de *TLR2* aumenta com a progressão da periodontite. Observou-se um aumento ao comparar os estadios iniciais (I/II) com os estadios mais avançados (III/IV) da doença, embora o baixo número de amostras em cada grupo não permita tirar conclusões definitivas (figura 14). Este resultado indica que a expressão do gene *TLR2* pode ser regulada positivamente à medida que a periodontite progride, contribuindo potencialmente para a resposta inflamatória observada nesta condição.

Uma vez que não foi possível amplificar o gene *TLR4*, foi testada a quantificação da proteína *TLR4* por ELISA. No entanto, a quantidade de proteína *TLR4* estava abaixo do limite de detecção do *kit*, pelo que os resultados são inconclusivos para este marcador molecular.

5. DISCUSSÃO

A periodontite é considerada a sexta doença osteolítica mais prevalente em humanos (10). De facto, a periodontite está fortemente associada a doenças sistémicas, sendo considerada um problema de saúde pública (11). De um modo geral, as evidências têm demonstrado que mecanismos epigenéticos conservados contribuem para a manutenção da inflamação e de estados fisiológicos/aberrantes relacionados com alterações da expressão génica (11). Das alterações de expressão de genes associados à doença periodontal, destacam-se os recetores *TLR* pelo seu papel na ativação da resposta inflamatória. No presente estudo, com o objetivo de identificar alterações na expressão dos genes *TLR2* e *TLR4* na saliva de pacientes com doença periodontal, foi caracterizado um grupo representativo de 21 pacientes. Destes, 52% eram mulheres e 48% homens, com idades a oscilar entre um mínimo de 21 anos e um máximo de 77 anos, com prevalência dos que possuem idades compreendidas entre os 62-77 anos. Estudos mostram que a prevalência e a gravidade da doença periodontal aumentam com a idade (34, 35). Papapanou e Sanz (36) demonstraram que a taxa média anual de perda óssea entre os indivíduos com 70 anos de idade era de 0,28 mm em comparação com 0,07 nos indivíduos com 25 anos de idade. O aumento da gravidade da doença periodontal e da perda óssea com a idade está provavelmente relacionado com o período de tempo durante o qual os tecidos periodontais foram expostos à placa bacteriana, e considera-se que reflete a história oral cumulativa do indivíduo (36). Mais estudos efetuados em alguns dos países desenvolvidos, como Noruega, Estados Unidos, China, entre outros, mostram padrões variáveis de progressão da doença periodontal (37, 38). Estes estudos mostraram que a destruição periodontal avançada e a perda óssea são raramente observadas em indivíduos com menos de 40 anos. Um resultado semelhante foi observado mesmo na população idosa, em que a doença periodontal avançada afeta apenas uma pequena fração deste grupo etário. No entanto, entre aqueles com doença avançada, ocorre uma maior degradação com o aumento da idade (38, 39).

Há também evidência de uma maior destruição periodontal entre os homens em comparação com a população feminina (38, 39). As razões para estas diferenças entre os sexos não são claras, mas pensa-se que estão relacionadas com os baixos

níveis de literacia e menor adesão aos cuidados de higiene oral, para além de diferenças ao nível hormonal e do sistema imunitário. Assim, o sexo pode interferir com os efeitos de outros fatores e deve ser controlado para a investigação da doença (38,39).

O estudo mostra que, aproximadamente 71,5% dos participantes apresentavam baixo índice de literacia em saúde oral crítica. Quando ajustado para idade e sexo, o baixo índice de literacia em saúde oral crítica foi associado a cáries não tratadas, uso de escova dentária <3 vezes ao dia e uso irregular do fio dental. De acordo com estes dados, também na nossa amostra mais de metade dos pacientes indicou o uso de escova dentária <3 vezes por dia e não usa fio dentário.

Foram ainda encontradas associações significativas para baixa literacia em saúde oral crítica quando os resultados foram: presença de biofilme, visita ao médico dentista apenas para emergência e prevalência de impacto da saúde oral na qualidade de vida (40). Considerando que um baixo nível de literacia em saúde oral crítica pode ser modificado, devem ser apoiadas estratégias de promoção da saúde oral direcionadas para a melhoria da literacia crítica em saúde oral em populações adultas.

Quanto aos fatores de risco associados à doença periodontal, 38% dos pacientes não tem hábitos tabágicos, 33% são fumadores e 29% ex-fumadores. O consumo de tabaco é um dos fatores de risco modificáveis e tem uma enorme influência no desenvolvimento, progressão e resultados do tratamento da doença periodontal. O tabagismo é um fator de risco independente para o início, extensão e gravidade da doença periodontal (41, 42). Além disso, fumar pode diminuir as hipóteses de um tratamento bem-sucedido. O tratamento de pacientes com doença periodontal deve centrar-se na compreensão da relação entre fatores genéticos e ambientais (42). As investigações epidemiológicas mostram que o tabagismo e a doença periodontal estão intimamente relacionados (41, 42).

Maioritariamente, os pacientes da amostra estudada possuem patologias, entre os quais fatores de risco cardiovasculares (hipertensão arterial e colesterol elevado), patologia respiratória, doenças alérgicas, diabetes e patologia cardiovascular. Apenas seis pacientes não possuem outras patologias. É importante compreender os fatores etiológicos e a patogénese da doença periodontal para reconhecer e apreciar os fatores de risco associados. Uma vez que a doença

periodontal é multifatorial, a gestão eficaz da doença requer uma compreensão clara dos fatores de risco associados. Os doentes com diabetes *mellitus* tipo 1 ou tipo 2 não diagnosticada ou mal controlada correm um risco mais elevado de doença periodontal (43, 44). Existem muitos estudos que demonstram uma associação entre a diabetes e uma maior suscetibilidade a infeções orais, incluindo a doença periodontal, sendo que um dos sinais orais importantes da diabetes *mellitus* é a gengivite ou a periodontite. A periodontite também progride mais rapidamente em diabéticos mal controlados e a idade precoce de início da doença é vista como um fator de risco para doenças mais graves (45, 46). Por outro lado, a maioria dos pacientes diabéticos bem controlados pode manter a saúde periodontal e responderá favoravelmente ao tratamento periodontal (46).

Vários mecanismos biológicos têm sido propostos para explicar a relação entre as doenças periodontais e as doenças cardiovasculares, tais como elevadas concentrações de colesterol e a ação das bactérias orais no processo de aterosclerose, ou a participação de proteínas de fase aguda que podem aumentar na periodontite crónica (47, 48). A periodontite pode provocar uma resposta inflamatória sistémica, pelo que estes pacientes merecem mais atenção. Por outro lado, a doença periodontal é capaz de predispor à doença cardiovascular devido à rica fonte de espécies microbianas subgengivais e à resposta do hospedeiro. Além disso, deve estar-se consciente de que estas doenças partilham muitos fatores de risco e que existem semelhanças evidentes com os mecanismos patogénicos básicos (48). A periodontite está associada ao aumento do nível da proteína C-reativa e do fibrinogénio, independentemente das doenças coronárias. Além disso, existem evidências que sugerem que o aumento dos níveis de marcadores sistémicos de inflamação, como a proteína C-reativa e a interleucina-6, está associado a doenças cardiovasculares. Sabe-se que a bacteremia causada por periodontite e doença dentária é a principal causa de endocardite infecciosa (48). Em particular, os pacientes que foram submetidos a cirurgia valvular cardíaca têm um risco significativo de endocardite infecciosa com risco de vida. Estudos epidemiológicos e microbiológicos deram crédito ao conceito de que a doença periodontal pode ser um fator de risco separado para doenças cardiovasculares e doenças cerebrovasculares (48, 49).

Na amostra do presente estudo, prevalecem os pacientes que não tomam medicação, no entanto, alguns deles são polimedicados (antidepressivos, anticoncepcional, diuréticos, doença pulmonar obstrutiva crônica, colesterol, antiagregante plaquetário, anti-hiperglicêmico, anti-histamínico, redução da frequência cardíaca, protetor gástrico e anticoagulante). Os medicamentos podem ser um fator que contribui para as doenças periodontais. Alguns medicamentos diminuem significativamente o fluxo salivar, tais como, anti-hipertensivos, analgésicos narcóticos, alguns tranquilizantes e sedativos, anti-histamínicos e antimetabólicos. Outros medicamentos, particularmente aqueles em forma líquida ou mastigável que contêm açúcar adicionado, alteram o pH e a composição da placa bacteriana, tornando-a mais capaz de aderir às superfícies dentárias (49, 50). Medicamentos como os anticonvulsivos, os agentes bloqueadores dos canais de cálcio e a ciclosporina podem induzir o crescimento gengival excessivo (51).

Como já referido, a classificação das doenças periodontais e peri-implantares em 2017 teve consequências consideráveis para a prática dentária. Os termos periodontite “agressiva” e “crônica” foram substituídos por uma única categoria, “periodontite”. Esta nova classificação inclui a estratificação da periodontite em estádios e graus, promovendo um diagnóstico periodontal dimensional, que oferece ao médico dentista a possibilidade de obter um diagnóstico e um plano de tratamento individualizados para cada paciente (52). A gravidade e a extensão da doença baseiam-se no grau mensurável de tecido destruído e danificado (53). O desenvolvimento da periodontite é categorizado em estádios I a IV, enquanto a complexidade da doença é classificada em Graus A, B ou C. No presente estudo, prevaleceram os pacientes com Periodontite, II, B (7 pacientes), seguindo-se os que apresentam Periodonto Saudável (4 pacientes). Com 3 pacientes cada, gengivite e Periodontite, I, B. Apenas 2 pacientes apresentam Periodontite, III, B e apenas um paciente apresenta Periodontite, III, C e outro Periodontite, I, C. No global, prevalecem os pacientes nos estádios I/II e grau B.

De um ponto de vista microbiológico, a doença periodontal é caracterizada por alterações quantitativas e qualitativas no microbioma oral da área subgengival dos dentes afetados (54). Os fatores determinantes, unanimemente aceites pelos investigadores especializados envolvidos na etiopatologia da doença periodontal, são representados tanto pela virulência microbiana como pelas implicações da

resposta imunitária modificada contra esta virulência, que, em última análise, conduzem à destruição irreversível do periodonto (54, 55).

No que respeita aos hábitos de higiene oral, todos os pacientes usam escova dentária, com prevalência dos que lavam os dentes 2 vezes por dia, seguindo-se os que o fazem 3 vezes por dia e 1 vez por dia. Maioritariamente, os pacientes não usam fio dentário, com apenas 43% a usá-lo, entre os quais 29% utilizam-no às vezes e apenas 14% diariamente. No que se refere ao índice de placa bacteriana, verifica-se um mínimo de 10% e um máximo de 64%. Os índices de quantificação da placa bacteriana são frequentemente utilizados para avaliar a higiene oral pessoal. A educação para o autocuidado e o autodiagnóstico é eficaz na prevenção e no controlo das doenças dentárias e periodontais (56). Ambas causam perda de dentes, são preveníveis e continuam a ser um importante problema de saúde pública. Embora ambas as doenças sejam multifatoriais, o biofilme dentário é um dos principais determinantes biológicos comuns ao desenvolvimento das duas doenças. Assim, a prevenção e a gestão da cárie e das doenças periodontais baseiam-se na remoção do biofilme através do controlo autorrealizado da placa dentária (56, 57). No entanto, a remoção adequada do biofilme é difícil, pois requer destreza (54). Como resultado, a maioria dos pacientes não apresenta níveis adequados de higiene oral, pelo que existe uma necessidade de desenvolver e validar ferramentas de diagnóstico não invasivas e estratégias de mudança de comportamento preventivo.

O uso de marcadores moleculares, particularmente de amostras recolhidas de forma não invasiva, como a saliva, pode ser bastante útil na deteção precoce da doença periodontal, na prevenção de perda óssea e dentária associada a esta patologia, e na redução de possíveis complicações sistémicas da mesma. Entre estes biomarcadores, as alterações na expressão dos genes TLR, em particular, *TLR2* e *TLR4*, foram reportadas em pacientes com periodontite (36, 55).

Para quantificar o *TLR2* nas amostras do presente estudo, o gene foi amplificado por RT-PCR e o valor médio da intensidade das bandas para o *TLR2* foi dividido pelo valor médio da intensidade das bandas para o gene controlo *GAPDH*. Esta análise sugeriu que a expressão relativa do *TLR2* aumenta quando se compararam os estadios iniciais (I/II) com os estadios mais avançados (III/IV) da doença (figura 14). No entanto, há apenas 3 amostras em cada grupo, o que não

permite tirar conclusões definitivas. Para além disso, nos estadios iniciais (I/II) as amostras eram de pacientes do sexo feminino, enquanto nos estadios avançados (III/IV) eram pacientes do sexo masculino, o que pode constituir um fator de enviesamento dos resultados observados. Apesar destas limitações, os resultados parecem indicar que a expressão do gene *TLR2* pode ser regulada positivamente à medida que a periodontite progride, contribuindo potencialmente para a resposta inflamatória observada nesta condição. A periodontite contribui também para a translocação bacteriana sistémica, onde as células mononucleares periféricas do sangue (PBMCs) podem atuar como transportadoras. O *TLR2* medeia a resposta à infeção e ativa as respostas inflamatórias (56). A metilação do DNA pode ser induzida por bactérias e contribui para a modulação dessa resposta. As PBMCs de pacientes com periodontite mostram um fenótipo hiperinflamatório e uma regulação positiva do *TLR2*, contribuindo, assim, para uma carga inflamatória sistémica sustentada em pacientes com esta condição. O *TLR2*, expresso pelo hospedeiro, deteta uma variedade de ligandos bacterianos, incluindo lipopolissacáridos acilados e lipoproteínas (57, 58).

O presente estudo teve como principal limitação o baixo número de amostras recolhidas, o que condicionou o estabelecimento de grupos homogéneos para uma análise molecular robusta. No futuro, o estudo deve ser repetido com um maior número de amostras, de forma a separar os grupos de pacientes consoante o estadio e grau de periodontite. Para além deste fator, a colheita de amostras de pacientes saudáveis deve ser aumentada, para ter um controlo representativo do sexo e faixa etária dos pacientes, bem como de outros fatores que possam apresentar como patologias, toma de medicação, hábitos de higiene oral e tabágicos.

Outra limitação, de origem técnica, foi a falta de amplificação do gene *TLR4* por RT-PCR, apesar de se terem usado diferentes pares de primers e temperaturas de annealing. Foi ainda testada a quantificação direta dos níveis de proteína *TLR4* através de ELISA, também sem sucesso, pelo que os resultados foram inconclusivos para este marcador. Para ultrapassar esta limitação, poderá ser testada a expressão do gene e/ou da proteína em amostras de esfregaços bucais, em vez de saliva.

Ainda como trabalho futuro, deve ser feita a caracterização do microbioma das amostras recolhidas (saliva e/ou biofilme), uma vez que o desequilíbrio na

microbiota oral está intimamente relacionado com a doença periodontal, podendo servir também como biomarcador de diagnóstico e progressão desta patologia.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo foi feita a caracterização sociodemográfica e clínica de um grupo representativo de amostras de 21 pacientes, maioritariamente com Periodontite, II, B, do sexo feminino e com idades compreendidas entre os 62-77 anos. Apenas uma pequena percentagem de pacientes não tinha hábitos tabágicos, e apresentavam outras patologias, com prevalência para fatores de risco cardiovasculares (hipertensão arterial e colesterol elevado).

No que respeita aos hábitos de higiene oral, todos os pacientes usam escova dentária, mas, na maioria dos casos, não usam fio dentário. No que se refere ao índice de placa bacteriana, obteve-se um mínimo de 10% e um máximo de 64%.

A análise molecular identificou alterações na expressão do gene *TLR2* na saliva, que aumentou com a progressão da periodontite quando se compararam os estadios iniciais (I/II) com os estadios mais avançados (III/IV) da doença.

Como perspetivas futuras, sugere-se a replicação deste estudo com mais amostras em cada um dos grupos, bem como tentar identificar novos marcadores para além dos genes *TLR2* e *TLR4* que possam auxiliar no diagnóstico precoce, no prognóstico, no tratamento e evolução da doença periodontal. As amostras de biofilme podem ser utilizadas em estudos para identificação e quantificação de outros biomarcadores moleculares, como por exemplo para quantificação de bactérias periodontopatogénicas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Bhatta R. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int Rev Immunol*. 2018 Jan 2;37(1):20-36.
2. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390(10100):1211–1259
3. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *ScientificWorldJournal*. 2020 May 28;2020:2146160. doi: 10.1155/2020/2146160.
4. Ravidà A, Qazi M, Troiano G, Saleh MHA, Greenwell H, Kornman K, Wang HL. Using periodontal staging and grading system as a prognostic factor for future tooth loss: A long-term retrospective study. *J Periodontol*. 2020 Apr;91(4):454-461.
5. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018 Jun;89 Suppl 1:S159-S172. doi: 10.1002/JPER.18-0006. Erratum in: *J Periodontol*. 2018 Dec;89(12):1475.
6. Gupta N, Rath S K, Lohra P. Comparative evaluation of accuracy of periodontal probing depth and attachment levels using a Florida probe versus traditional probes. *Med J Armed Forces India* 2015; 71: 352-358.
7. Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomyetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol*. 2000 Jan;71(1):14-21.
8. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, Geisinger ML, Genco RJ, Glogauer M, Goldstein M, Griffin TJ, Holmstrup P, Johnson GK, Kapila Y, Lang NP, Meyle J, Murakami S, Plemons J, Romito GA, Shapira L, Tatakis DN, Teughels W, Trombelli L, Walter C, Wimmer G, Xenoudi P, Yoshie H. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the

Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S74-S84.

9. Herrera D, Retamal-Valdes B, Alonso B, Feres M. Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. *J Clin Periodontol.* 2018 Jun;45 Suppl 20:S78-S94.

10. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *ScientificWorldJournal.* 2020 May 28;2020:2146160. doi: 10.1155/2020/2146160.

11. Needleman I., Garcia R., Gkrantias N., Kirkwood K.L., Kocher T., Iorio A.D., Moreno F., Petrie A. Mean annual attachment, bone level, and tooth loss: A systematic review. *J. Periodontol.* 2018;89:S120–S139. doi: 10.1002/JPER.17-0062.

12. Billings M., Holtfreter B., Papapanou P.N., Mitnik G.L., Kocher T., Dye B.A. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *J. Clin. Periodontol.* 2018;45:S130–S148.

13. Albandar JM, Susin C, Hughes FJ. Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S183-S203.

14. Needleman I, Garcia R, Gkrantias N, Kirkwood KL, Kocher T, Iorio AD, Moreno F, Petrie A. Mean annual attachment, bone level, and tooth loss: A systematic review. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S120-S139.

15. AlQallaf H, Hamada Y, Blanchard S, Shin D, Gregory R, Srinivasan M. Differential profiles of soluble and cellular toll like receptor (TLR)-2 and 4 in chronic periodontitis. *PLoS One.* 2018 Dec 20;13(12):e0200231.

16. Shaddox L.M., Spencer W.P., Velsko I.M., Al-Kassab H., Huang H., Calderon N., Aukhil I., Wallet S.M., Hiba H. Localized aggressive periodontitis immune response to healthy and diseased subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 2016;43:746–753.

17. Tsai C.-C., Ho Y.-P., Chou Y.-S., Ho K.-Y., Wu Y.-M., Lin Y.-C. Aggregatibacter (Actinobacillus) actimycetemcomitans leukotoxin and human

periodontitis—A historic review with emphasis on JP2. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 2018;34:186–193.

18. Stylianou E. Epigenetics of chronic inflammatory diseases. *J. Inflamm. Res.* 2018;12:1–14.

19. Li C, Yu R, Ding Y. Association between *Porphyromonas Gingivalis* and systemic diseases: Focus on T cells-mediated adaptive immunity. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Nov 17;12:1026457.

20. AlQallaf H, Hamada Y, Blanchard S, Shin D, Gregory R, Srinivasan M. Differential profiles of soluble and cellular toll like receptor (TLR)-2 and 4 in chronic periodontitis. *PLoS One.* 2018 Dec 20;13(12):e0200231.

21. Gu Y, Han X. Toll-Like Receptor Signaling and Immune Regulatory Lymphocytes in Periodontal Disease. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020; 21(9):3329.

22. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2014 Feb;64(1):57-80.

23. Wallet SM, Puri V, Gibson FC. Linkage of Infection to Adverse Systemic Complications: Periodontal Disease, Toll-Like Receptors, and Other Pattern Recognition Systems. *Vaccines (Basel).* 2018 Apr 5;6(2):21.

24. Darby I. Risk factors for periodontitis & peri-implantitis. *Periodontol 2000.* 2022 Oct;90(1):9-12.

25. Relvas M, López-Jarana P, Monteiro L, Pacheco JJ, Braga AC, Salazar F. Study of Prevalence, Severity and Risk Factors of Periodontal Disease in a Portuguese Population. *J. Clin. Med.* 2022, 11, 3728.

26. Ramenzoni LL, Lehner MP, Kaufmann ME, Wiedemeier D, Attin T, Schmidlin PR. Oral Diagnostic Methods for the Detection of Periodontal Disease. *Diagnostics (Basel).* 2021 Mar 22;11(3):571.

27. Sanz M, Ceriello A, Buyschaert M, Chapple I, Demmer RT, Graziani F, Herrera D, Jepsen S, Lione L, Madianos P, Mathur M, Montanya E, Shapira L, Tonetti M, Vegh D. Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and

diabetes by the International diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018 Mar;137:231-241.

28. Preshaw PM. Detection and diagnosis of periodontal conditions amenable to prevention. *BMC Oral Health.* 2015;15 Suppl 1(Suppl 1):S5.

29. Laberge S, Akoum D, Wlodarczyk P, Massé J-D, Fournier D, Semlali A. The Potential Role of Epigenetic Modifications on Different Facets in the Periodontal Pathogenesis. *Genes.* 2023; 14(6):1202. <https://doi.org/10.3390/genes14061202>

30. Nazir M., Al-Ansari A., Al-Khalifa K., Alhareky M., Gaffar B., Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *Sci. World J.* 2020;2020:2146160.

31. Ramenzoni LL, Lehner MP, Kaufmann ME, Wiedemeier D, Attin T, Schmidlin PR. Oral Diagnostic Methods for the Detection of Periodontal Disease. *Diagnostics (Basel).* 2021 Mar 22;11(3):571.

32. Kamil W, Al Habashneh R, Khader Y, Al Bayati L, Taani D. Effects of nonsurgical periodontal therapy on C-reactive protein and serum lipids in Jordanian adults with advanced periodontitis. *Journal of Periodontal Research.* 2011;46(5):616–621.

33. Landry RG, Jean M. Periodontal Screening and Recording (PSR) Index: precursors, utility and limitations in a clinical setting. *Int Dent J.* 2002 Feb;52(1):35-40

34. Clark D, Kotronia E, Ramsay SE. Frailty, aging, and periodontal disease: Basic biologic considerations. *Periodontol 2000.* 2021 Oct;87(1):143-156.

35. Hoeksema AR, Peters LL, Raghoobar GM, Meijer HJA, Vissink A, Visser A. Health and quality of life differ between community living older people with and without remaining teeth who recently received formal home care: a cross sectional study. *Clin Oral Investig.* 2018;22(7):2615–2622.

36. Papapanou PN, Sanz M. Periodontitis: Consensus Report of Workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology.* 2018; 45, S162-S170.

37. AlJehani YA. Risk factors of periodontal disease: review of the literature. *Int J Dent.* 2014;2014:182513. doi: 10.1155/2014/182513. Epub 2014 May 20. Retraction in: *Int J Dent.* 2021 Feb 12;2021:8735071.

38. Lipsky MS, Su S, Crespo CJ, Hung M. Men and Oral Health: A Review of Sex and Gender Differences. *American Journal of Men's Health*. 2021;15(3).
39. Batista MJ, Lawrence HP, Sousa MDLR. Oral health literacy and oral health outcomes in an adult population in Brazil. *BMC Public Health*. 2017 Jul 26;18(1):60. doi: 10.1186/s12889-017-4443-0. Erratum in: *BMC Public Health*. 2017 Sep 22;17(1):736.
40. Borojevic T. Smoking and periodontal disease. *Mater Sociomed*. 2012;24(4):274-6.
41. Zhang Y, He J, He B, Huang R, Li M. Effect of tobacco on periodontal disease and oral cancer. *Tob Induc Dis*. 2019 May 9;17:40.
42. Silva H. Tobacco Use and Periodontal Disease—The Role of Microvascular Dysfunction. *Biology*. 2021; 10(5):441.
43. Stegeman CA. Oral manifestations of diabetes. *Home Healthcare Nurse*. 2005;23(4):233–242.
44. Baeza M, Morales A, Cisterna C, Cavalla F, Jara G, Isamitt Y, Pino P, Gamonal J. Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: systematic review and meta-analysis. *J Appl Oral Sci*. 2020 Jan 10;28:e20190248.
45. Promsudthi A, Pimapansri S, Deerochanawong C, Kanchanasavita W. The effect of periodontal therapy on uncontrolled type 2 diabetes mellitus in older subjects. *Oral Diseases*. 2005;11(5):293–298.
46. Păunică I, Giurgiu M, Dumitriu AS, Păunică S, Pantea Stoian AM, Martu M-A, Serafinceanu C. The Bidirectional Relationship between Periodontal Disease and Diabetes Mellitus—A Review. *Diagnostics*. 2023; 13(4):681.
48. Gani DK, Lakshmi D, Krishnan R, Emmadi P. Evaluation of C-reactive protein and interleukin-6 in the peripheral blood of patients with chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. 2009 May;13(2):69-74.
49. Cohen DW. Periodontal medicine in the next millennium. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 2000;20(1):6–7.
50. Tsai C.Y., Tang C.Y., Tan T.S., Chen K.H., Liao K.H., Liou M.L. Subgingival microbiota in individuals with severe chronic periodontitis. *J. Microbiol. Immunol. Infect*. 2018;51:226–234.

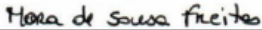
51. Sharma N., Bhatia S., Sodhi A.S., Batra N. Oral microbiome and health. *AIMS Microbiol.* 2018;4:42–66.
52. Bechir ES. The Clinical and Microbiological Effects of LANAP Compared to Scaling and Root Planing Alone in the Management of Periodontal Conditions. *Diagnostics (Basel).* 2023 Jul 22;13(14):2450.
53. Tonetti M.S., Sanz M. Implementation of the new classification of periodontal diseases: Decision-making algorithms for clinical practice and education. *J. Clin. Periodontol.* 2019;46:398–405.
54. Azevedo AM, Carvalho Rocha LP, de Faria Amormino SA, Cavalieri Gomes C, Ornelas Dutra W, Santiago Gomez R, da Costa JE, Rocha Moreira P. DNA methylation profile of genes related to immune response in generalized periodontitis. *J Periodontal Res.* 2020 Jun;55(3):426-431.
55. Dongiovanni P, Meroni M, Casati S, Goldoni R, Thomaz DV, Kehr NS, Galimberti D, Del Fabbro M, Tartaglia GM. Salivary biomarkers: novel noninvasive tools to diagnose chronic inflammation. *Int J Oral Sci.* 2023 Jun 29;15(1):27.
56. Chapple IL, Bouchard P, Cagetti MG, Campus G, Carra MC, Cocco F. Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2017;44 Suppl 18:S39–S51.
57. Uçan Yarkaç F, Babayiğit O, Gokturk O. Associations between immune-inflammatory markers, age, and periodontal status: a cross-sectional study. *Odontology.* 2024 Mar 6.
58. AlQallaf H, Hamada Y, Blanchard S, Shin D, Gregory RL, M. Srinivasan M. Differential profiles of soluble and cellular toll like receptor 2 and 4 in chronic periodontitis. 2018. bioRxiv 355347; 1-19.

9. ANEXOS

Anexo 1 – Parecer da Comissão de Ética da Universidade Católica Portuguesa – Mandato 2019/2023



Parecer sobre o projeto nº 157 (pedido de alteração)
Comissão de Ética para a Saúde da Universidade Católica Portuguesa
Mandato 2019/2023

Projeto de Investigação Na reunião do dia 17 de fevereiro de 2022 a CES-UCP esteve reunida e apreciou do ponto de vista ético os elementos submetidos pela investigadora, em resposta a parecer prévio da CES. Sobre a apreciação redige o seguinte parecer.
Título: Estratégias moleculares e imunológicas em doenças inflamatórias: a ponte para a Medicina de Precisão (OralPreciseMed)
Investigadora principal: Ana Karina Silva Mendes. Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde (CIIS) Equipa de investigação: Ana Peixoto Gomes (investigadora), Maria José Correia (investigadora), Raquel Silva (investigadora), Ana Sofia Duarte (investigadora), Nuno Rosa (investigador), Gustavo Fernandes (médico dentista), Patrícia Couto (médico dentista), Patrícia Correia (médico dentista), Anna Carolina Moura (médico dentista), Tiago Marques (médico dentista), Nélio Veiga (médico dentista)
Assunto: Integração na equipa de investigação de Dimitris N. Tatakis (Ohio State University College of Dentistry) Documentos - Apresentação de breve sinopse curricular; Justificação da necessidade de adaptação ao protocolo inicialmente previsto. “Um dos grandes objetivos deste projeto é a identificação de moléculas na saliva que sirvam de biomarcadores no prognóstico e gestão dos casos clínicos de doença periodontal. De forma a ser possível a validação dos métodos propostos inicialmente, é premente o enriquecimento do tipo de amostra a analisar. Desta forma, a inclusão de amostras de tecido gengival e de sangue periférico dos pacientes com doença periodontal, é fundamental. A presença do Investigador (Professor) Dimitris Tatakis, na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa, no âmbito do Programa Fulbright, possibilita a sua integração na equipa do projeto OralPreciseMed. Dado o seu vasto conhecimento na área da periodontologia, a sua participação será uma mais-valia para a execução do projeto”. - Atualização do modelo de consentimento informado, esclarecido e livre para participação em estudos de investigação (de acordo com a declaração de Helsínquia e a convenção de Oviedo) - Descrição do processo de recolha do tipo de amostra.
Estiveram presentes na reunião nº 37 da CES-UCP Presidente: Doutora Mara de Sousa Freitas Vice-Presidente: Doutora M ^a Teresa Marques Doutor Jerónimo Santos Trigo Doutor Pedro Garcia Marques Dr. Eugénio Fonseca Doutora Ana Mineiro Zaky Doutora Marta Brites
Conclusão Ouído o Relator, e o plenário da reunião do dia 17 de fevereiro de 2022, realizada por videoconferência, esta CES delibera, por unanimidade, a emissão de Parecer Favorável . Esta CES solicita à Investigadora Principal que, aquando da conclusão do estudo, lhe seja enviada uma síntese dos resultados obtidos e respetivas conclusões, via eletrónica, para o correio eletrónico da CES UCP.
A Presidente,  Mara de Sousa Freitas 17/02/2022

Anexo 2 – Questionário



Questionário de dadores

A- Dados da amostra

Questão 1.

Código do dador

Questão 2.

Data da colheita

Questão 3.

Material Biológico

- Saliva
- Biofilme
- Biofilme radicular
- Bochecho
- Biópsia
- Não recolheu amostra biológica

Questão 4.

Amostragem

- 1º amostragem
- Amostras follow-up

Questão 5.

Local de amostragem

- Clínica dentária - Universidade Católica Portuguesa de Viseu
- Lar Viscondessa de São Caetano
- Centro Social Paroquial de Rio de Loba
- Atividade Sénior Viseu
- Outros _____



Questão 6.

Investigador / Médico dentista responsável

B- Dados pessoais do dador

Questão 7.

Género

- Feminino
- Masculino
- Não binário
- Prefere não mencionar

Questão 8.

Data de nascimento

Questão 9.

Etnia

- Caucasiana
- Africana
- Oriental
- Cigana
- Oriental
- Outra _____

Questão 10.

Nível de escolaridade

- Básico (até ao 9ºano)
- Médio (até ao 12ºano)
- Licenciatura, Mestrado ou Doutoramento
- Outros
- Não respondeu



C- Informações de saúde geral do dador

Questão 11.

Tem ou teve alguma patologia?

	Sim	Não	Não sabe
Cardíaca			
Sanguínea			
Fígado			
Renal			
Intestinal			
Estômago			
Cancro			
Alergias			
Outros			

Questão 12.

Especifique o tipo de patologia (s)

Questão 13.

Se teve cancro foi sujeito a algum tratamento de radioterapia ou quimioterapia?

- Sim
- Não

Questão 14.

Se sim, há quanto tempo (anos)?

Questão 15.

Tem hipertensão?

- Sim
- Não



Questão 16.

Tem diabetes?

- Sim, Tipo 1
- Sim, Tipo 2
- Sim, mas não sabe o tipo
- Não tem

Questão 17.

Histórico familiar – Existem doenças na família como?

- Doenças cardíacas

- Diabetes

- Cancro

- Outras

D- Informações sobre a medicação

Questão 18.

Faz algum tipo de tratamento médico ou medicação com regularidade?

- Sim

- Não

- Não sabe



Questão 19.

Para além da medicação regular, fez mais algum tipo de tratamento médico ou medicação nos últimos 30 dias?

- Sim
- Não
- Não sabe

Questão 20.

Fez antibiótico nos últimos 3 meses?

- Sim
- Não
- Não sabe

Questão 21.

Recebeu a vacina da gripe nos últimos 6 meses?

- Sim
- Não
- Não sabe

E- Hábitos – Consumo de tabaco

Questão 22.

Fuma ou já fumou?

- Sim
- Não
- Ex-fumador

Questão 23.

Se fuma ou já fumou, com que idade deixou de fumar?

- Sabe
- Não sabe



Questão 24.

Quantos cigarros fuma ou fumava por dia?

- Até 10 cigarros
- Mais de 10 cigarros
- Não sabe

Questão 25.

Se é ex-fumador há quantos anos deixou de fumar?

- Sabe
- Não sabe

Questão 26.

Usa drogas recreativas?

- Sim
- Não

F- Hábitos - Consumo de álcool

Questão 27.

Bebe ou já bebeu, regularmente bebidas alcoólicas?

- Sim
- Não

Questão 28.

Se bebe ou já bebeu, com que idade começou?

- Sabe

- Não sabe

Questão 29.

Se bebe ou já bebeu, preencha o seguinte quadro:

	Até 14	Mais de 14	Não sabe	Não bebe
Nº de copos de vinho (por semana)				
Nº de cervejas (por semana)				
Nº de bebidas digestivas (por semana)				



Questão 30.

Se deixou de beber foi com que idade?

- Sabe

- Não sabe

G- Hábitos - Alimentares

Questão 31.

Utiliza açúcar nos lanches entre refeições?

- Sim
- Não
- Não sabe

Questão 32.

Número de lanches com açúcar entra as refeições:

- 1x
- 2x
- 3x
- 4x
- Mais que 4x

H- Nível hormonal

Questão 33.

Toma anticoncecionais?

- Sim
- Não

Questão 34.

Há quantos dias teve a última menstruação?



Questão 35.

Está grávida?

- Sim
- Não

Questão 36.

Se sim, de quantas semanas?

Questão 37.

Encontra-se na menopausa?

- Sim
- Não

Questão 38.

Se sim, há quantos anos?

I- Hábitos e comportamentos de higiene oral

Questão 39.

Costuma escovar os dentes diariamente?

- Sim
- Não

Questão 40.

Se sim, quantas vezes por dia?

- 1x
- 2x
- 3x
- Mais de 3x



Questão 41.

Escova os dentes com uma pasta fluoretada?

- Sim
- Não

Questão 42.

Utiliza uma pasta fluoretada 5000ppm diariamente?

- Sim
- Não

Questão 43.

Utiliza um colutório com fluor (0,05% NaF) diariamente?

- Sim
- Não

Questão 44.

Durante os últimos 6 meses utilizou clorhexidina uma vez por semana?

- Sim
- Não

Questão 45.

Costuma utilizar fio dentário?

- Sim, diariamente
- Sim, às vezes
- Não
- Não sei o que é o fio dentário

Questão 46.

Utiliza aparelho ortodôntico?

- Sim
- Não



Questão 47.

Quando foi a última vez que visitou um dentista?

- Há 1 ano
- Há 2 anos
- Entre 2 a 5 anos
- Há mais de 5 anos
- Nunca fui ao dentista

Questão 48.

Fez algum destes tratamentos (restaurações, TER, extrações) nos últimos 3 anos?

- Sim
- Não

Questão 49.

Alguma vez lhe foi aplicado por um profissional de saúde verniz ou gel de fluor em consultório nos últimos 6 meses?

- Sim
- Não

Questão 50.

Sente que a sua boca esta "seca"?

- Sim
- Não

Questão 51.

Se sim, tenta compensar este facto com maior consumo de água

- Sim
- Não



Questão 52.

Sente alguma dor na região da face ou no interior da boca?

- Sim
- Não

Questão 53.

Sente alguma alteração no paladar?

- Sim
- Não

J- Saúde oral – Lesões de cárie e diagnóstico periodontal

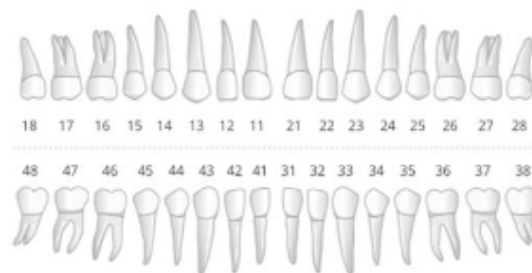
Questão 54. Condição atual de cada elemento dentário

	Presente	Ausente	Hígido	Cariado	Restaurado	Implante	Raiz residual	Desvitalizado
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
21								
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28								
31								
32								
33								
34								
35								
36								



37								
38								
41								
42								
43								
44								
45								
46								
47								
48								

Questão 55. ICDAS



Odontograma

- 1º - 18º
- 1º - 17º
- 1º - 16º
- 1º - 15º
- 1º - 14º
- 1º - 13º
- 1º - 12º



- o 1º - 11º
- o 2º - 21º
- o 2º - 22º
- o 2º - 23º
- o 2º - 24º
- o 2º - 25º
- o 2º - 26º
- o 2º - 27º
- o 2º - 28º
- o 3º - 38º
- o 3º - 37º
- o 3º - 36º
- o 3º - 35º
- o 3º - 34º
- o 3º - 33º



- o 3° -32°
- o 3° - 31°
- o 4° - 41°
- o 4° - 42°
- o 4° - 43°
- o 4° - 44°
- o 4° - 45°
- o 4° - 46°
- o 4° - 47°
- o 4° - 48°

Questão 56. Lesões de cárie

- o Inicial (ICDAS 1 - 2)
- o Moderada (ICDAS 3 – 4)
- o Extensa (ICDAS 5 – 6)



Questão 57.

Profundidade de sulcos e fissuras?

- Rasos
- Profundos

Questão 58.

Exposição radicular

- Sim
- Não

Questão 59. Diagnóstico periodontal (marcar uma resposta ou mais)

Nota: Como questões a seguir referem-se ao diagnóstico periodontal (nova classificação), Preencher Perio Chart e copiar informações para o questionário. <https://www.periodontalchart-online.com/uk/>

- Saúde periodontal
- Periodonto reduzido
- Gengivite
- Periodontite localizada (menos que 30%)
- Periodontite generalizada (maior que 30%)
- Padrão Molar Incisivo
- Estadio I
- Estadio II
- Estadio III
- Estadio IV
- Grau A
- Grau B
- Grau C
- Mucosite Peri-implantar
- Peri-implantite
- Estomatite protética Classe I
- Estomatite protética Classe II
- Estomatite protética Classe III

Questão 60.

BOP – Sangramento à sondagem



Questão 61.

Índice de placa

Questão 62.

Média da profundidade de sondagem

Questão 63.

Necessidade de tratamento médico-dentário?

- Sim
- Não

K- Saúde oral – Próteses dentárias

Questão 64.

Utiliza prótese dentária?

- Sim
- Não

Questão 65.

Em qual das arcadas?

- Superior
- Inferior
- Ambas

Questão 66. Qual o tipo de prótese?

	Total	Parcial acrílica	Parcial esquelética
Superior			
Inferior			

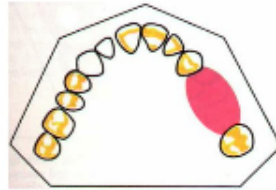


Questão 67. A que tipo de classificação de Kennedy corresponde a prótese que utiliza?

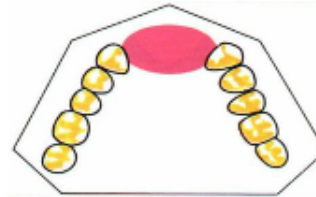
- Classe I: desdentado bilateral posterior ■ Classe II: desdentado unilateral posterior



- Classe III: desdentado unilateral posterior incompleto



- Classe IV: desdentado anterior



	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV	Classe V	Sem classificação
Superior						
Inferior						

Questão 68.

Quando utiliza a(s) prótese(s)?

- Sempre
- Às vezes
- Só durante as refeições
- Nunca

Questão 69.

Como faz a higienização da sua prótese?

- Só com água
- Com água e escova
- Pastilhas de limpeza
- Fio dentário
- Escovilhão
- Produto dentário (qual?)
- _____
- Não faz higienização da prótese



Questão 70.

Quantas vezes por dia é feita essa higienização?

- 1x
- 2x
- 3x
- 4x
- 5x
- 6x

Questão 71.

Costuma tirar a prótese para dormir?

- Sempre
- Às vezes
- Raramente
- Nunca

Questão 72.

Há quanto tempo utiliza uma prótese dentária (anos)?

Questão 73.

Há quanto tempo tem a atual prótese dentária? (anos)

Questão 74.

Qual a frequência de consultas de manutenção protética?

- 3 em 3 meses
- 6 em 6 meses
- 1x por ano
- Nunca

Questão 75.

Necessidade de reabilitação protética?

- Sim
- Não

Anexo 3 – Consentimento OralPreciseMed



CONSENTIMENTO INFORMADO, ESCLARECIDO E LIVRE PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDOS DE INVESTIGAÇÃO (de acordo com a Declaração de Helsínquia e a Convenção de Oviedo)

Título do estudo: OralPreciseMed

A doença periodontal é considerada a doença crónica inflamatória mais comum em humanos e representa um enorme desafio nos cuidados de saúde. Desta forma, é importante adquirir um maior conhecimento acerca de mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão desta doença.

Os dados obtidos neste estudo vão auxiliar o médico dentista num tratamento mais eficaz da doença periodontal fazendo com que haja um melhor prognóstico (melhor probabilidade de sucesso no tratamento).

A recolha das amostras (saliva e/ou fluido crevicular) é indolor e não requer nenhum procedimento clínico adicional. O único incómodo será o tempo adicional da consulta devido à entrevista que os investigadores tudo farão para minimizar.

Este estudo não envolve procedimentos que não se enquadrem na prática clínica normal nem pretende testar novos produtos ou medicamentos. As amostras recolhidas destinam-se apenas a ser analisadas neste estudo. A participação neste estudo é totalmente voluntária e anónima, não acarretando quaisquer custos. É fundamental que perceba que pode retirar o seu consentimento em qualquer etapa do estudo. Não precisa para tal de apresentar explicações aos responsáveis pela investigação, nem terá qualquer prejuízo, assistenciais ou outros, caso não queira participar. Ao decidir participar pode colocar todas as questões que considerar necessárias para o seu esclarecimento. Mesmo depois de assinado o documento de consentimento esclarecido e informado, pode em qualquer altura solicitar a sua exclusão do estudo. Para tal basta contactar a investigadora principal deste estudo: kmendes@ucp.pt ou através do número de telefone 232419500. A participação não implica qualquer remuneração ou encargo económico para o participante. Os participantes colaboram de forma voluntária, livre e esclarecida.

ma vez que neste estudo não existem riscos para o paciente não estão previstas medidas de mitigação. Ainda assim é importante referir que os investigadores responsáveis garantem aos participantes o exercício dos seus direitos em relação aos dados recolhidos (como o acesso, a retificação ou a eliminação), bastando o mesmo ser solicitado ao Encarregado da Proteção de dados deste estudo (contactos no final do documento). Para além do referido, o participante pode efetuar uma reclamação junto do Encarregado de Proteção de Dados (DPO - Data Protection Officer) da UCP, que a encaminhará para a Comissão Nacional de Proteção de Dados (CNPD), caso considerem que existe um incumprimento legal à proteção de dados por parte da equipa de investigação (contactos no final do documento).

Os investigadores garantem o anonimato e a confidencialidade dos dados recolhidos. A informação recolhida apenas pelo Investigador Principal, num momento único de observação, em ambiente de privacidade, não permite a identificação do participante e é usada apenas para os fins científicos do presente estudo. Os dados são registados e armazenados no computador pessoal do investigador, com acesso protegido e apenas durante o estudo. Concluída a investigação, os dados armazenados serão eliminados e é garantido que a identificação do participante nunca se torne pública.

Os resultados deste estudo serão partilhados com a comunidade científica através de publicações em revistas com revisão por pares e constituirão parte do corpo de informação e conhecimento científico que permite desenvolver novas formas de diagnóstico precoce e monitorização da saúde com a utilização de amostras não invasivas.

Os dados a recolher neste estudo são de duas naturezas: dados da sua história clínica que serão recolhidos do seu processo clínico confirmados por entrevista e amostras biológicas de saliva e soro crevicular. As recolhas das amostras biológicas são não invasivas e totalmente indolores.

Os dados recolhidos são totalmente anonimizados e os investigadores (para além do investigador principal) terão apenas acesso à informação codificada não sendo possível identificar a que indivíduo pertence.

Os dados e as amostras serão preservados durante 5 anos, período após o qual serão destruídas.

Este documento pretende informá-lo(a) e propor-lhe a sua participação neste estudo.

O(a) participante é livre de aceitar, ou não, participar no estudo proposto, podendo mudar de opinião e revogar o seu consentimento, abandonando o estudo se assim considerar oportuno, sem qualquer tipo de penalização ou represália.

Confirmando que expliquei à pessoa abaixo indicada, de forma adequada e inteligível, os procedimentos necessários ao ato referido neste documento. Respondi a todas as questões que me foram colocadas e assegurei-me de que houve um período de reflexão suficiente para a tomada da decisão. Também garanti que, em caso de recusa, serão assegurados os melhores cuidados possíveis nesse contexto, no respeito pelos seus direitos.

ASSINATURA

Nome do profissional responsável pela recolha: _____

Contacto Institucional: _____

Data: ___ / ___ / ___

Eu, _____

Fui informado(a) pelo profissional responsável pela recolha _____

acerca do estudo clínico no qual me é proposto participar.

Fui ainda informado(a) dos riscos possíveis deste estudo.

Pude colocar todas as perguntas ou dúvidas que achei necessárias e entendi todas as explicações que me foram proporcionadas.

Dou o meu consentimento por escrito para participar neste estudo,

ASSINATURA

(nome completo do participante)

Consentimento informado do representante legal

Declaro ter lido e compreendido este documento bem como as informações verbais que me foram fornecidas pela pessoa que acima assina. Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste estudo sem qualquer tipo de consequências. Desta forma, como representante legal do (a) _____ aceito a sua participação neste estudo e permito que os dados e amostras biológicas recolhidas sejam usados para fins de investigação/publicação científica, desde que a minha identidade e da pessoa a meu encargo como seu representante legal seja mantida confidencial.

SE NÃO FOR O PRÓPRIO A ASSINAR POR IDADE OU INCAPACIDADE

Nome:

BI/CC nº:

Data ou validade ____ / ____ / _____

Grau de parentesco ou tipo de representação:

Assinatura:

Contacto do Encarregado de Proteção de Dados (DPO - Data Protection Officer) da UCP:

Data Protection Officer - UCP
Dra. Frederica Campos de Carvalho
Contacto telefónico: +351 217214179
E-mail: compliance.rgpd@ucp.pt

Contacto do Encarregado de Proteção de Dados (DPO - Data Protection Officer) da FMD-UCP:

Data Protection Officer FMD- UCP
Dr. Paulo Alexandre de Oliveira Castro Ribeiro
Contacto telefónico: +351 232 419 500
E-mail: pribeiro@ucp.pt

Anexo 4 - Resultado do PCR de gradiente para testar a temperatura ótima dos primers

