

# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **ANÁLISE DO FLUIDO CREVICULAR COMO MEIO AUXILIAR DE DIAGNÓSTICO NA PERIODONTITE E PERI-IMPLANTITE**

Trabalho submetido por  
**Madalena Santa Clara Gomes Furtado**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**outubro de 2023**



# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **ANÁLISE DO FLUIDO CREVICULAR COMO MEIO AUXILIAR DE DIAGNÓSTICO NA PERIODONTITE E PERI-IMPLANTITE**

Trabalho submetido por  
**Madalena Santa Clara Gomes Furtado**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Mestre José Maria Cardoso**

e coorientado por  
**Prof. Doutor Ricardo Alves**

**outubro de 2023**



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Mestre José Maria Cardoso pela disponibilidade, empenho e apoio incondicional que me deu ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Ricardo Alves pelo apoio e conhecimento transmitido ao longo deste trabalho.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, por me ter proporcionados os melhores cinco anos da minha vida e por me ter feito conhecer pessoas que para sempre levarei no coração.

A todos os docentes da Clínica Egas Moniz, por todos os ensinamentos que me transmitiram tanto académicos como pessoais.

Aos meus pais, por todo o amor, sacrifício e educação que me proporcionaram, por sempre me apoiarem incondicionalmente, por sempre acreditaram em mim e nunca me deixarem baixar a cabeça. Sou vos eternamente grata.

À minha avó Celina por ser sempre o meu porto seguro e transmissor de fé.

Ao meu avô João por sempre acreditar em mim e sempre me transmitir a confiança necessária.

À minha família por todo o amor, motivação e incentivo que sempre me proporcionaram.

Aos meus amigos que considero família Isabel, Fátima, Bia, Carlota pelo apoio e confiança transmitidos ao longos dos infinitos anos de amizade.

Aos meus colegas que se tornaram amigos Inês, Maria Inês, Laura e Ivo que sempre estiveram do meu lado e tornaram estes anos inesquecíveis, por toda a amizade e por todos os momentos vividos que vou recordar de coração cheio.

Ao Afonso, meu colega de box, pela sua amizade, por animar sempre o meu dia, por ter sido um grande apoio, por me ter ensinado sempre a procurar enfrentar novos desafios e por ter tornado todo o meu percurso académico mais feliz.

O meu sincero obrigada a todos!



## RESUMO

A periodontite é classificada como a sexta doença com maior prevalência na humanidade, sendo uma doença inflamatória crônica que afeta os tecidos de suporte do dente, levando a uma reabsorção óssea irreversível.

Os implantes têm sofrido uma grande evolução e, cada vez mais, se considera serem o tipo de reabilitação oral ideal para a maioria das situações, no entanto, é acompanhada por um conjunto de possíveis complicações que podem comprometer a reabilitação, como a peri-implantite.

O diagnóstico destas duas patologias baseia-se essencialmente na avaliação de parâmetros clínicos e radiográficos, no entanto, esses parâmetros refletem o estado clínico passado, e não o atual, ou a progressão futura da doença. Biomarcadores específicos e sensíveis para doenças periodontais e peri-implantares têm sido amplamente examinados para abordar estas questões.

**Objetivos:** O presente trabalho tem como objetivo identificar quais os biomarcadores do fluido crevicular mais específicos e sensíveis para um diagnóstico precoce e monitorização da periodontite e da peri-implantite.

**Materiais e Métodos:** Para a realização deste trabalho foi realizada uma pesquisa bibliográfica em motores de pesquisa eletrônicos nomeadamente PubMed, Cochrane Library e Google Académico no âmbito de encontrar artigos que dessem respostas aos objetivos em causa. Apenas artigos em que foi conseguido o acesso ao texto completo foram considerados. Foram incluídos artigos até Julho de 2023, dando mais destaque a artigos publicados nos últimos dez anos.

**Palavras-chave:** “periodontitis”, “peri-implantitis”, “crevicular fluid”, e “biomarker” foram utilizadas com diferentes combinações juntamente com os operadores Boolean “AND”, “OR”, “NOT”.



## **ABSTRACT**

Periodontitis is classified as the sixth most prevalent disease in humanity and is a chronic inflammatory disease that affects the supporting tissues of the tooth, leading to irreversible bone resorption.

Implants have evolved greatly and are increasingly considered to be the ideal type of oral rehabilitation for most situations. However, they are accompanied by a number of possible complications that can jeopardise rehabilitation, such as peri-implantitis.

The diagnosis of these two pathologies is essentially based on the assessment of clinical and radiographic parameters; however, these parameters reflect the past clinical state, not the current one or the future progression of the disease. Specific and sensitive biomarkers for periodontal and peri-implant diseases have been widely examined to address these issues.

**Objectives:** This study aims to identify which crevicular fluid biomarkers are the most specific and sensitive for early diagnosis and monitoring of periodontitis and peri-implantitis.

**Materials and Methods:** To carry out this study, a bibliographic search was carried out using electronic search engines such as PubMed, the Cochrane Library and Google Scholar in order to find articles that provided answers to the objectives in question. Only articles in which access to the full text was possible were considered. Articles up to July 2023 were included, with more emphasis on articles published in the last ten years.

**Keywords:** “periodontitis”, “peri-implantitis”, “crevicular fluid” and “biomarker” were used in different combinations together with the Boolean operators "AND", "OR", "NOT".



## ÍNDICE GERAL

<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>II. DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Periodontite.....</b>	<b>13</b>
1.1. Definição .....	13
1.2. Prevalência.....	13
1.3. Etiologia .....	13
1.4. Patogênese .....	14
1.5. Diagnóstico .....	17
<b>2. Peri-Implantite.....</b>	<b>19</b>
2.1. Definição .....	19
2.2. Prevalência.....	19
2.3. Etiologia .....	19
2.4. Patogênese .....	20
2.5. Diagnóstico .....	22
<b>3. Epitélio Juncional .....</b>	<b>24</b>
3.1. Origem.....	24
3.2. Histologia .....	24
<b>4. Fluido crevicular gengival e peri-implantar .....</b>	<b>25</b>
4.1. Definição .....	25
4.2. Composição .....	26
<b>5. Recolha do Fluido Crevicular .....</b>	<b>28</b>
5.1. Métodos de recolha .....	28
5.2. Fatores que influenciam a recolha .....	30
<b>6. Definição de Biomarcador .....</b>	<b>31</b>
<b>7. Biomarcadores do fluido crevicular.....</b>	<b>32</b>
7.1. Biomarcadores Inflamatórios .....	33
7.2. Biomarcadores da degradação da matriz extracelular .....	35
7.3. Biomarcadores Ósseos.....	37
<b>8. Evidência científica da associação de biomarcadores com a periodontite..</b>	<b>40</b>
<b>9. Evidência científica da associação de biomarcadores com a peri-implantite ...</b>	<b>46</b>
<b>III. Conclusão.....</b>	<b>51</b>
<b>IV. Bibliografia .....</b>	<b>53</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> A localização anatômica do fluido crevicular gengival no indivíduo saudável. Adaptado de (Khurshid, Mali, Naseem, Najeeb, & Zafar, 2017).....	26
<b>Figure 2;</b> Descrição da composição do FCG. Legendas: TNF- Fator de necrose tumoral. (adaptado de Fatima et al., 2021) .....	27
<b>Figure 3:</b> Colheita de FCG intracrevicular .....	30
<b>Figure 4:</b> Aparelho Periotron.....	30
<b>Figure 5 :</b> Critérios de um biomarcador ideal. Adaptado de (Gul et al., 2020) .....	32
<b>Figure 6:</b> Tipos de biomarcadores orais na doença periodontal. Adaptado de (Shazam et al., 2020).....	33



## LISTA DAS ABREVIATURAS E SIGLAS

**ALP-** Fosfatase alcalina

**EJ-** Epitélio Juncional

**ELISA-** do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**FCG-** Fluido crevicular gengival

**FCP-** Fluido crevicular periimplantar

**ICAM\_1-** Molécula de adesão intercelular 1

**ICTP-** Telopectídeo carboxi-terminal do colagénio tipo I

**IFMA-** Ensaio imunofluorométrico

**IL-** Interleucina

**MCP-1-** Proteína quimioatraente de monócitos

**miRNA-** Micro ácido ribonucleico

**MMP-** Metaloproteinases da matriz

**NTx-** Telopectídeo N-terminal do colagénio tipo I

**OPG-** Osteoprotegerina

**PCR-** Reação em cadeia da polimerase

**PGE2-** Prostaglandina E2

**PMNs-** Leucócitos polimorfonucleares

**RANK-** Recetor ativador do fator nuclear kappa-B

**RANKL-** Ligando do recetor ativador do fator nuclear kappa-B

**RNA-** Ácido ribonucleico

**SP-** Substância P

**TIMPs-** Inibidor tecidual de metaloproteinases

**TNF  $\alpha$ -** Fator de necrose tumoral alfa

**TRAP-** Fosfatase ácida resistente a Tartarato

**TRPV4-** Recetor de potencial transitório vanilóide tipo 4



## I. INTRODUÇÃO

A periodontite é descrita como uma doença inflamatória crônica, a qual afeta os tecidos de suporte do dente, levando deste modo a uma reabsorção óssea irreversível (Subbarao et al., 2019). A peri-implantite é uma condição patológica que ocorre nos tecidos em redor dos implantes, sendo caracterizada pela inflamação da mucosa peri-implantar com a subsequente perda progressiva de osso de suporte. O diagnóstico clínico destas duas condições, implica uma perda irreversível dos tecidos que circundam os dentes ou implantes, respetivamente (Yakar et al.,2019).

Contudo, quer a periodontite quer a peri-implantite são acompanhadas por alterações precoces no fluido crevicular gengival (FCG) e no peri-implantar (FCP) (Yakar et al.,2019).

O fluido crevicular é um transudado/exsudado fisiológico, composto por uma variedade de substâncias e células derivadas da circulação capilar e venosa da mucosa do sulco gengival. O fluido crevicular contém proteínas, enzimas e outras moléculas que podem ser úteis na deteção de alterações da flora oral (Subbarao et al., 2019).

Quando ocorre o processo de inflamação, a taxa e a dinâmica de produção dessas substâncias ficam alteradas, provocando assim uma alteração na composição do fluido, transformando-se num exsudado inflamatório, sendo que algumas destas substâncias podem ser consideradas como biomarcadores (Barros, Williams, Offenbacher, & Morelli,2016). Existe evidência que a medição do nível dessas substâncias inflamatórias pode auxiliar no diagnóstico e avaliação da progressão da patologia periodontal, como também na avaliação da eficácia dos tratamentos (Barros et al.,2016).

Assim, o fluido crevicular torna-se uma ferramenta importante no diagnóstico precoce da periodontite e peri-implantite dado a sua capacidade de fornecer importantes informações acerca da saúde do periodonto envolvente, podendo assim fornecer um melhor entendimento do *status* periodontal dos pacientes (Alassy et al., 2019).

Um conhecimento mais aprofundado do fluido crevicular pode auxiliar no desenvolvimento de um plano de tratamento mais eficaz e precoce, evitando que o diagnóstico seja apenas efetuado em estádios avançados da patologia em que já ocorreram sinais clínicos de destruição tecidual. Esse diagnóstico precoce ajudará em tratamentos mais eficazes, proporcionando uma melhoria da qualidade de vida do paciente (Barros et al.,2016).



## **II. DESENVOLVIMENTO**

### **1. Periodontite**

#### **1.1. Definição**

A Doença periodontal pode classificar-se como gengivite ou periodontite. (Tonetti, Greenwell, & Kornman, 2018)

A periodontite caracteriza-se por uma patologia inflamatória crónica, mediada pelo hospedeiro, que afeta os tecidos de suporte do dente levando a uma reabsorção óssea irreversível.

#### **1.2. Prevalência**

Presentemente sabe-se que a periodontite afeta entre 20 a 50% da população adulta mundial, sendo que na sua forma mais avançada está identificada como a 6º doença mais prevalente na humanidade (Kinane, Stathopoulou, & Papapanou, 2017).

A periodontite é também a infeção bacteriana mais comum no mundo (Almehmadi & Alghamdi, 2018).

A periodontite é responsável por uma porção considerável do edentulismo e da disfunção mastigatória (Papapanou et al., 2018). Desta patologia resultam várias consequências nomeadamente: um aumento de cerca de 21% nas despesas médicas dos utentes ao longo da vida, um outro impacto negativo reflete-se na saúde geral, e ainda numa maior taxa de admissão hospitalar reflexo dos efeitos desta infeção. Relativamente a esta última situação os efeitos não estão só limitados localmente, mas também a nível sistémico (Gul, Abdulkareem, Sha, & Rawlinson, 2020).

#### **1.3. Etiologia**

Presentemente sabemos que esta doença é largamente dependente da reposta inflamatória do hospedeiro aos componentes bacterianos da microflora oral, embora outros fatores tais como, acumulação de biofilme nas superfícies dentárias, diferenças genéticas, historial de patologia periodontal, tabagismo, stress, má higiene oral, consumo

de álcool e respiração oral também possam contribuir para a propagação e desenvolvimento de doenças periodontais (Shazam, Shaikh, & Hussain, 2020).

A placa bacteriana constitui o fator etiológico principal, da qual resultam inúmeras consequências nomeadamente, o aumento da retenção de placa supragengival, a redução da ação dos mecanismos de defesa, e dos métodos de higiene oral, ocorrendo uma migração para apical da flora bacteriana (Hajishengallis, 2015). Daqui resulta que, as bactérias são os agentes primários da iniciação e progressão da patologia, sabendo-se também que não são as únicas, pois os mediadores químicos da inflamação que resultam da agressão microbiana também apresentam um papel preponderante na patogénese da doença (Baddam et al., 2021).

É estimado que a cavidade oral seja colonizada por cerca de 700 espécies bacterianas, das quais cerca de 400 se encontram em áreas subgengivais.

A *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a *Tannerella forsythia*, e a *Porphyromonas gingivalis* são consideradas os principais agentes microbianos causadores de periodontite (Shazam et al., 2020).

#### 1.4. Patogénese

A gengivite caracteriza-se por uma doença inflamatória restringida ao epitélio gengival, e ainda ao tecido conectivo em redor dos dentes, normalmente causada pela resposta imunológica à alteração da microflora oral, ou ainda devido a outras causas tais como:

- infeções bacterianas;
- infeções virais;
- infeções fúngicas;
- traumas;
- distúrbios hormonais;
- reações alérgicas;
- causas nutricionais;
- indução medicamentosa (Rathee & Jain 2023).

Esta patologia não tem como consequência, nem perda de inserção, nem perda óssea (Rathee & Jain 2023). Esta doença é clinicamente diagnosticada através dos

seguintes sinais: edema, rubor, superfície brilhante, friável e hemorragia à sondagem (Rathee & Jain 2023). Existe evidência científica que a gengivite apresenta um bom prognóstico, desde que seja diagnosticada atempadamente e devidamente tratada através da remoção do agente causador da mesma, constituindo uma condição reversível (Kinane et al., 2017). Contrariamente, caso a gengivite não venha a ser resolvida, pode ocorrer penetração da inflamação para tecidos mais profundos (epitélio juncional), desenvolvendo-se assim várias alterações na hemóstase, causando perda óssea e originando assim a periodontite. (Rathee & Jain 2023). Contudo, nem todos os casos de gengivite evoluem para casos de periodontite, mesmo na existência de fatores locais idênticos, estando esta progressão dependente da resposta imunológica do hospedeiro (Kumar, 2019).

Numa fase inicial da inflamação ao nível do periodonto, o hospedeiro apresenta infecção subgengival, estando assim o dano tecidual restrito à gengiva, e assistindo-se a que nenhuma bactéria específica ou os seus metabólitos penetrem no organismo. Se a inflamação não for resolvida, o exsudado inflamatório aumenta e altera o microbioma da bolsa, levando a um crescimento excessivo de bactérias comensais, incluindo a *P. gingivalis* (Nuñez-Belmar et al., 2022). O microbioma subgengival, associado à inflamação, desenvolve uma disbiose associada à patologia (Kumar, 2019). Com o contínuo confronto bacteriano e com a inflamação gengival descontrolada, a barreira epitelial é quebrada e forma-se um novo ambiente, é nesta fase que ocorre então a infiltração bacteriana. Ao ocorrer inflamação contínua verificamos que a mesma leva a perda de fibras do ligamento periodontal, à perda de inserção clínica, bem como ao aprofundamento das bolsas periodontais. No entanto é importante realçar que a reabsorção óssea não é causada diretamente por microrganismos. Os linfócitos B e os linfócitos T, neutrófilos e monócitos/macrófagos, quando são estimulados produzem mediadores inflamatórios, os quais numa fase posterior podem contribuir para a resposta inflamatória, proporcionando a persistência da patologia, além de estimularem e ativarem osteoclastos, levando à degradação tecidual e à reabsorção óssea (Yucel-Lindberg & Båge, T, 2013). Embora a formação e reabsorção óssea sejam processos que ocorrem continuamente no osso alveolar saudável, na periodontite perde-se esse equilíbrio, levando a uma maior reabsorção óssea. (Micó-Martínez, Almiñana-Pastor, Alpiste-Illueca, & López-Roldán, 2021).

Quando ocorre infiltração celular os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) são os primeiros a serem detetados, são o tipo de célula dominante no epitélio juncional (EJ) e no sulco gengival (Yucel-Lindberg & Båge, T, 2013). Os marcadores de tecidos ósseos como, osteoprotegerina (OPG), ligando do recetor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL), telopeptídeo carboxi-terminal do colagénio tipo I (ICTP), telopeptídeo N-terminal do colagénio tipo I (NTx), entre outros, são moléculas importantes que podem ter um papel na fisiopatologia da doença periodontal (Shazam et al., 2020).

Existem vários estudos que demonstram que as bactérias periodonto-patogénicas quando em contacto com o sulco inflamado ou com o epitélio da bolsa, podem entrar na circulação sanguínea do paciente, o que pode resultar na produção de mediadores inflamatórios destrutivos em outros locais do corpo humano (Micó-Martínez et al, 2021). Essa possibilidade vem comprovar que os pacientes portadores desta infeção, podem apresentar maior risco de desenvolver outras condições sistémicas tal como obesidade, doença coronária e diabetes (Micó-Martínez et al, 2021). Existe inclusivamente, evidência da presença de microrganismos patogénicos periodontais gram-negativos em placas de ateroma (Bagavad Gita et al., 2019). Estas condições sistémicas, podem também por outro lado influenciar a resposta do hospedeiro a agentes microbianos levando a uma excessiva destruição periodontal (Micó-Martínez et al, 2021).

Assim, conclui-se que a severidade e progressão da periodontite estão dependentes do equilíbrio dinâmico das interações entre alterações da microbiota oral e a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro (Micó-Martínez et al, 2021). Se a periodontite não for tratada atempada e devidamente, levará a uma situação de destruição óssea, causando mobilidade dentária e eventual perda dentária (Baddam et al., 2021).

Importa clarificar, que a resposta do hospedeiro está incorporada em duas linhas de defesa, uma primeira linha refere-se à imunidade inata e uma segunda linha à imunidade adaptativa. O sistema imunológico é um sistema de defesa notavelmente adaptativo, o qual está em constante evolução tendo como objetivo primordial proteger o organismo contra a invasão de microrganismos patogénicos (Micó-Martínez et al, 2021). Daqui decorre que o sistema imunológico apresenta a capacidade de gerar uma enorme variedade de células e moléculas, capazes de reconhecer e eliminar inúmeros invasores (Kumar et al., 2013). Para o desenvolvimento da periodontite num determinado paciente, para além dos fatores locais, como a acumulação de placa bacteriana, é também necessário um hospedeiro que esteja suscetível à patologia (Kumar, 2019).

### **1.5. Diagnóstico**

Considera-se que, o diagnóstico da periodontite se baseia na avaliação da presença e extensão da inflamação gengival, sendo que esta é calculada por parâmetros clínicos englobando:

- hemorragia à sondagem;
- recessão gengival;
- sondagem da profundidade da bolsa;
- perda de inserção;
- mobilidade dentária;
- avaliação do padrão radiográfico da extensão da perda óssea alveolar (Ramenzoni et al., 2021).

Na prática clínica, o instrumento utilizado para o diagnóstico periodontal é principalmente uma sonda periodontal romba com graduações milimétricas, a qual tem como funções medir a profundidade de sondagem, medir a recessão gengival e avaliar a presença de hemorragia à sondagem. Como meios complementares de diagnóstico usam-se radiografias com o objetivo de determinar a presença e o padrão de perda óssea alveolar (Gul et al., 2020). No diagnóstico devem ser tidas em consideração inúmeras variáveis tais como a idade do paciente, a sua história médica e odontológica, a eventual realização de alguns tratamentos prévios, e sinais e sintomas como: dor, ulceração e depósitos microbianos (Tonetti & Sanz, 2019).

Anteriormente na avaliação do diagnóstico da periodontite, esta podia ser amplamente classificada em periodontite crônica ou agressiva, sendo que a primeira estava associada a uma vasta acumulação de placa bacteriana e a segunda associada à existência de poucos fatores locais (Armitage, 1999). Podendo ainda subclassificar-se em localizada ou generalizada (Tonetti et al., 2018) Contudo, no ano de 2017, foi proposto pela Federação Europeia de Periodontologia e a Academia Americana de Periodontologia uma nova classificação para as doenças periodontais e peri-implantares (Caton et al., 2018). Com base nessa classificação a periodontite deveria ser classificada com base num sistema de estádios e graus. O primeiro parâmetro do estágio representa a severidade da patologia, como também a complexidade do seu controlo, estando este dividido e classificado em quatro níveis numerados de I a IV (Papapanou et al., 2018). No estágio I

encontra-se a periodontite representada no seu estado mais inicial e no IV encontra-se a periodontite num estado mais severo (Caton et al., 2018).

Para a classificação é necessário a avaliação de diferentes variáveis:

- perda de inserção clínica;
- quantidade e percentagem de perda óssea;
- profundidade de sondagem;
- presença e extensão de defeitos ósseos angulares;
- presença ou não de lesões de furca;
- presença de mobilidade dentária;
- perda dentária por razões periodontais (Caton et al., 2018).

O segundo parâmetro de avaliação refere-se ao grau, oferecendo-nos informações adicionais acerca das características biológicas da patologia, abrangendo não só aspetos relacionados com a sua progressão como também o estado geral de saúde do paciente, avaliando-se também a eventual exposição do doente a fatores de risco tais como o tabagismo e o controlo diabético (Papapanou et al., 2018). Daqui resulta que a análise do grau envolve uma avaliação da progressão da patologia, avaliando o risco de progressão adicional, bem como a demonstração do sucesso ou insucesso que os tratamentos possam revelar, e finalmente uma posterior avaliação do impacto que o tratamento possa gerar na saúde geral do paciente (Caton et al., 2018). A análise do grau pode-se dividir em 3 níveis, classificados da letra A à letra C, em que a letra A representa um baixo risco de progressão da doença e a letra C um elevado risco. (Caton et al., 2018)

Estes métodos de classificação são limitados a uma perspetiva histórica, não fornecendo informação sobre qual o estado atual da patologia, em que a primeira característica do diagnóstico da periodontite se encontra representada pela destruição de tecido periodontal, sendo que esta última é de todo irreversível. Como consequência do estado avançado da doença, provocado por um eventual diagnóstico tardio, muitas vezes as opções de tratamento ideais como abordagens regenerativas ou mesmo uma atitude preventiva ficam inviabilizadas (Ramenzoni et al., 2021).

## **2. Peri-Implantite**

### **2.1. Definição**

Com algumas semelhanças à gengivite e à periodontite, que afetam a dentição natural, temos as doenças peri-implantares (mucosite e peri-implantite) que afetam os tecidos em redor dos implantes dentários.

As doenças peri-implantares são classificadas em duas condições clínicas, sendo a primeira a mucosite peri-implantar, a qual se representa numa reação inflamatória reversível do tecido mole à volta do implante, com sinais clínicos de vermelhidão, edema e hemorragia à sondagem (Mahato, Wu, & Wang, 2016). A mucosite peri implantar é vista como a condição que precede a peri-implantite (Schwarz, Derks, Monje, & Wang, 2018).

A segunda doença, designada por peri-implantite, caracteriza-se por ser uma reação inflamatória, associada à infeção do tecido mole com progressiva e irreversível perda de tecido ósseo circundante de um implante osteointegrado, culminado em reabsorção óssea, formação de bolsas e supuração, até eventual perda do implante (Schwarz et al., 2018) A definição de peri-implantite baseia-se na concomitante presença de sinais de inflamação peri-implantar e perda óssea visível radiograficamente após o processo de cicatrização da colocação do implante (Delucchi et al., 2023).

### **2.2. Prevalência**

Constata-se que a mucosite peri-implantar é diagnosticada em cerca de 80% dos pacientes e em cerca de 50% de locais de implantes (Panayotov et al., 2023).

Alguns estudos estimam que a peri-implantite atinja cerca de 10% dos implantes e 20% dos pacientes, num período de 5 a 10 anos após a colocação dos implantes (Dursun & Tözüm, 2016).

### **2.3. Etiologia**

Atualmente, conseguiu-se concluir que a ocorrência das doenças peri-implantares está claramente associada a um mau controlo da placa bacteriana. Constatou-se também que existe uma maior tendência para o aparecimento da peri-implantite em pacientes com antecedentes de doença periodontal (Schwarz et al., 2018).

A peri-implantite aparenta ter uma progressão não linear e um padrão acelerado comparativamente à periodontite (Schwarz et al., 2018).

Verifica-se também que as bactérias ao redor dos implantes infetados são semelhantes às encontradas na periodontite, sendo que estas bactérias incluem membros das espécies do complexo vermelho: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* (Becker et al., 2014). A peri-implantite é na realidade uma infecção anaeróbica polimicrobiana, no entanto, em contraste com a periodontite, as lesões de peri-implantite abrigam bactérias que não fazem parte da microbiota da periodontite típica (Smeets et al., 2014). O *Staphylococcus aureus* parece desempenhar um papel predominante no desenvolvimento de peri-implantite, sendo que esta bactéria mostra uma alta afinidade com o titânio (Smeets et al., 2014).

É também de salientar que a acumulação excessiva de cimento na interface pilar-coroa, bem como a presença de saliências, favorecem claramente a deposição e retenção de placa bacteriana, levando assim a um agravamento da inflamação (Alani, Kelleher, & Bishop, 2014).

## 2.4. Patogénese

Tanto a periodontite como a peri-implantite estão associadas a um processo de reabsorção óssea, o que conseqüentemente se traduz num maior aumento do insucesso dos implantes dentários. (Sgolastra, Petrucci, Severino, Gatto, & Monaco, 2015). Para o sucesso de um implante, não deverá ocorrer inflamação durante o processo de osteointegração, embora a colonização bacteriana ocorra 30 minutos após a colocação do implante (Martínez-Hernández, Reyes-Grajeda, Hannig, & Almaguer-Flores, 2023).

No tecido peri-implantar, prevalece uma resposta imuno-inflamatória aguda do hospedeiro, resposta essa que ocorre da transição de uma relação simbiótica para uma disbiose, com a conseqüente libertação de produtos de degradação tecidual, pela ação bacteriana (Becker et al., 2014). Embora o Sétimo Workshop Europeu de Periodontologia tenha considerado claramente que as doenças peri-implantares apresentam características únicas, em contextos clínicos a peri-implantite é ainda frequentemente comparada à periodontite (Becker et al., 2014).

Contudo, importa salientar que os dentes e os implantes são anatomicamente diferentes e, como tal, o processo de desenvolvimento do biofilme também o é (Alani et

al., 2014). É de salientar que os dentes possuem fibras transeptais/dentogengivais não existentes nos implantes (Alani et al., 2014). A microflora que se estabelece no sulco peri-implantar é quase idêntica àquela encontrada nos dentes adjacentes. No entanto, a proliferação bacteriana na superfície do implante pode levar a uma ulceração epitelial com rutura da adesão do tecido conjuntivo peri-implantar, causando acumulação de biofilme (Alani et al., 2014). A rugosidade da superfície de um implante, a sua composição e a sua forma são fatores que, embora pensados de forma a alcançar a melhor qualidade de osteointegração, acabam por promover a acumulação de biofilme (Alani et al., 2014). Resulta assim que uma vez estabelecido o biofilme ocorre a inflamação do tecido mole em redor do implante, podendo resultar em mucosite peri-implantar (Alani et al., 2014).

Relativamente à mucosite peri-implantar e à peri-implantite, sabe-se que ambas não diferem substancialmente das lesões de gengivite e periodontite respetivamente, no que diz respeito à etiologia, à patogénese, à avaliação de risco, ao diagnóstico e também à terapia necessária. No entanto, assistimos a algumas distinções histopatológicas, tais como alterações estruturais verificadas na vascularização e na relação colagénio/fibroblastos e, ainda algumas discrepâncias funcionais, que são as responsáveis por refletirem as diferenças entre a periodontite e a peri-implantite (Bosshardt, 2018). Essas alterações, fazem com que na peri-implantite a acumulação de biofilme venha a provocar uma constante resposta inflamatória mais pronunciada e sentida no tecido mucoso ao redor dos implantes, quando comparada à resposta inflamatória dos dentes (Bosshardt, 2018).

Verifica-se que de uma forma semelhante à periodontite, também na peri-implantite existe uma resposta local do hospedeiro que medeia a reabsorção óssea. A resultante perda óssea alveolar leva a que deixe de haver contacto do osso com o implante, levando à formação de uma bolsa peri-implantar (Alani et al., 2014).

Pelo que foi exposto pode-se constatar que a extensão apical da lesão é mais pronunciada na peri-implantite do que na periodontite (Alani et al., 2014). A patologia associada à peri-implantite é mais agressiva e célere do que na periodontite e, portanto, pode desenvolver-se mais abruptamente (Alani et al., 2014).

É crucial que haja uma deteção precoce da mucosite peri-implantar, antes que ocorra a progressão para peri-implantite, uma vez que a mucosite é facilmente tratável, através de medidas de higiene oral e remoção do biofilme. Caso contrário, a colonização

bacteriana é prolongada, formando-se um infiltrado inflamatório que terá como consequência o provável desenvolvimento da peri-implantite (Alani et al., 2014).

## **2.5. Diagnóstico**

Um diagnóstico da peri-implantite numa fase inicial é crucial, uma vez que o diagnóstico tem como objetivo prevenir a necessidade de tratamento em fases mais avançadas. Contudo, um protocolo eficaz e previsível de tratamento da peri-implantite ainda não foi universalmente validado (Delucchi et al., 2023).

O objetivo do diagnóstico, é o reconhecimento da patologia a partir dos sinais clínicos e sintomas dos tecidos periimplantares, que indiquem um desvio do estado de saúde (Gul et al., 2020), destacando-se entre eles os seguintes:

- eritema ou edema mucogengival;
- aumento da profundidade de sondagem;
- hemorragia à sondagem e eventual supuração;
- perda óssea progressiva não linear (Berglundh et al., 2018).

Contudo é importante reconhecer-se que em algumas situações a peri-implantite pode apresentar-se assintomática (Berglundh et al., 2018).

De acordo com a última “ITI consensus report” ficou demonstrado que a presença de hemorragia à sondagem nem sempre é indicadora de inflamação peri-implantar, e igualmente que a avaliação da profundidade de sondagem sozinha não é suficiente para efetuar um diagnóstico da doença (Delucchi et al., 2023). Embora se considere que a sondagem peri-implantar possa ser útil para monitorizar a profundidade da lesão, esta pode manifestar-se insuficiente para determinar o padrão e extensão de perda óssea ao longo do tempo. Sendo assim, torna-se necessário recorrer-se à realização de exames radiográficos complementares para avaliação da perda óssea. (Heitz-Mayfield et al., 2018).

De qualquer forma, a perda óssea radiográfica nem sempre é indicadora de doença e a sua análise apresenta várias limitações entre as quais:

- o facto de só ser visível a perda óssea mesial e distal nas radiografias periapicais, bem como na ortopantomografia, sendo esses os exames radiográficos utilizados durante o diagnóstico;
- poder existir sobreposição de estruturas anatómicas;

- não ser perceptível a distinção entre a doença tratada e a doença não tratada;
- a possível distorção radiográfica. Apesar do auxílio a softwares programados para permitir a medição das diferenças do nível ósseo, bem como o uso do comprimento do implante como referência, mesmo assim é possível que nem todas as lesões sejam identificadas, dada a baixa sensibilidade (Delucchi et al., 2023).

Mesmo naquelas situações em que todos os parâmetros clínicos estejam presentes e se observe perda óssea radiográfica, essa informação não é suficiente para prever o risco de um paciente vir a desenvolver peri-implantite, nem de avaliar o seu prognóstico no início do processo inflamatório (Delucchi et al., 2023).

De acordo com o Workshop Mundial de Periodontologia de 2017, é unânime a aceitação de que a perda óssea seja o principal sinal clínico da peri-implantite. Da conjugação da medição da profundidade de sondagem das bolsas peri-implantares, com a presença ou não de edema e hemorragia à sondagem, conseguimos alcançar o diagnóstico da patologia (Berglundh et al., 2018). A perda óssea é considerada patológica, quando temos uma perda óssea radiográfica superior a 3 milímetros (Berglundh et al., 2018) Hoje ainda não é clara a forma de classificar a doença, uma vez que os critérios se baseiam essencialmente na presença ou não, de hemorragia à sondagem e na perda óssea observada radiograficamente (Gul et al., 2020). Contudo, estes parâmetros clínicos revelam-se ainda presentemente insuficientes para identificar de forma clara o estado atual da peri-implantite, como também a eventual possibilidade de ocorrer perda óssea adicional no futuro, tendo como consequência o insucesso dos implantes (Coli, Christiaens, Sennerby, & Bruyn, 2017).

Do que acima ficou exposto, verificamos a necessidade da criação e desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, mais rigorosos que venham permitir e facultar um prognóstico mais preciso da patologia peri-implantar. Idealmente o clínico conseguir prever a ocorrência da doença, antes mesmo do seu surgimento, iria permitir-lhe um controlo clínico mais apropriado, tendo em consideração as características individuais do paciente, de forma a assegurar a sobrevivência a longo prazo dos implantes dentários (Gul et al., 2020).

### **3. Epitélio Juncional**

#### **3.1. Origem**

O EJ encontra-se ao redor dos dentes bem como ao redor dos implantes. Contudo, importa clarificar que o EJ dos dentes se origina do epitélio reduzido do esmalte, enquanto que o EJ ao redor dos implantes provem de células epiteliais da mucosa oral. Portanto surge a questão se as características estruturais e funcionais desses dois epitélios juncionais são ou não idênticas (Bosshardt, 2018). Assim é importante analisar quais as semelhanças existentes entre os dois epitélios. De entre as semelhanças assistimos ao seguinte, ambos são estruturalmente semelhantes e de igual modo os marcadores envolvidos nos sistemas de defesa contra o ataque bacteriano expressam-se de igual forma (Nakamura, 2018).

#### **3.2. Histologia**

Em contraste com a maioria dos outros epitélios orais o EJ não tem queratinização da camada epitelial, a qual poderia funcionar como uma barreira física (Fischer & Aparicio, 2022). O EJ apresenta um epitélio não queratinizado com largos espaços intracelulares e rápido turnover celular (4 a 6 dias) o que permite que um exsudado e células inflamatórias penetrem em direção ao sulco gengival (Nakamura, 2018).

A permeabilidade que se observa no EJ, é controlada por uma densa inervação de fibras nervosas, essencialmente não mielinizadas (fibras C) bem como algumas fibras fracamente mielinizadas (fibras A delta), verificando-se que esta inervação é superior a qualquer outro epitélio oral (Fischer & Aparicio, 2022).

A substância P (SP) constitui um dos principais neuromediadores das fibras nervosas que enervam o EJ, as quais têm como missão o controle da permeabilidade do plexo vascular subepitelial, em resposta a estímulos mecânicos e químicos (Fischer & Aparicio, 2022).

Também se verifica a existência de recetores epiteliais (TRPV4) no EJ, os quais são sensíveis à temperatura superior a 25 graus celsius, bem como à hiposmolaridade, à pressão do fluxo dos espaços intrabuciais e ainda aos metabolitos da anandamida (ácido araquidônico) (Kitsuki et al., 2020).

Também se observa que inervação das fibras nervosas existente no EJ, apresenta um contacto direto com as suas células, bem como com os neutrófilos aí localizados, determinando assim a importância do EJ na participação da inflamação neurogénica baseada na SP, a qual na maioria das vezes é libertada de uma maneira antitrófica pelas fibras nervosas (Fischer & Aparicio, 2022).

Presentemente está assente que o EJ é o local do início da propagação da doença periodontal, e a conversão do EJ no epitélio da bolsa, é o momento marcante da progressão da gengivite para a periodontite (Bosshardt, 2018).

O EJ é constituído por uma membrana basal interna, com características atípicas ao nível da ligação cimento-esmalte (Bosshardt, 2018). Esta membrana apresenta uma maior permeabilidade às células plasmáticas, permitindo desta forma a ocorrência de um fluxo de líquido gengival crevicular rico em biomoléculas, bem como de células imunológicas migratórias (Fischer & Aparicio, 2022).

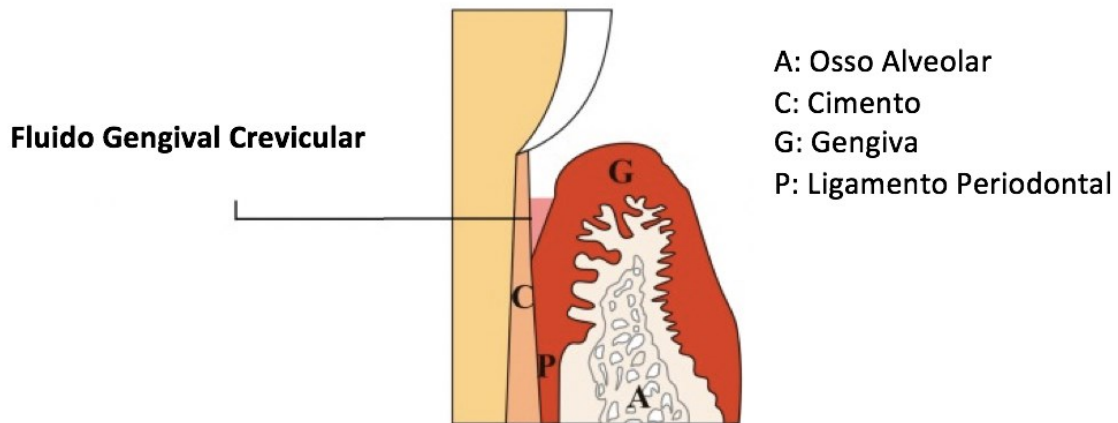
O EJ expressa na sua constituição a presença de interleucina 8 (IL-8) que regula a expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM\_1) que serve como recetor de ligação de neutrófilos (Fischer & Aparicio, 2022).

O FCG mantém a integridade do EJ, atuando como uma barreira fisiológica e sendo este, composto por proteínas derivados do soro, restos celulares dos tecidos e ainda derivados do biofilme subgengival (Vitkov et al., 2023).

#### **4. Fluido crevicular gengival e peri-implantar**

##### **4.1. Definição**

O fluido crevicular consiste num biofluido que provém dos tecidos periodontais, encontrando-se o mesmo no sulco entre o dente/implante e a gengiva marginal (figura 1) (Barros et al.,2016).



**Figura 1:** A localização anatômica do fluido crevicular gengival no indivíduo saudável. Adaptado de (Khurshid, Mali, Naseem, Najeeb, & Zafar, 2017)

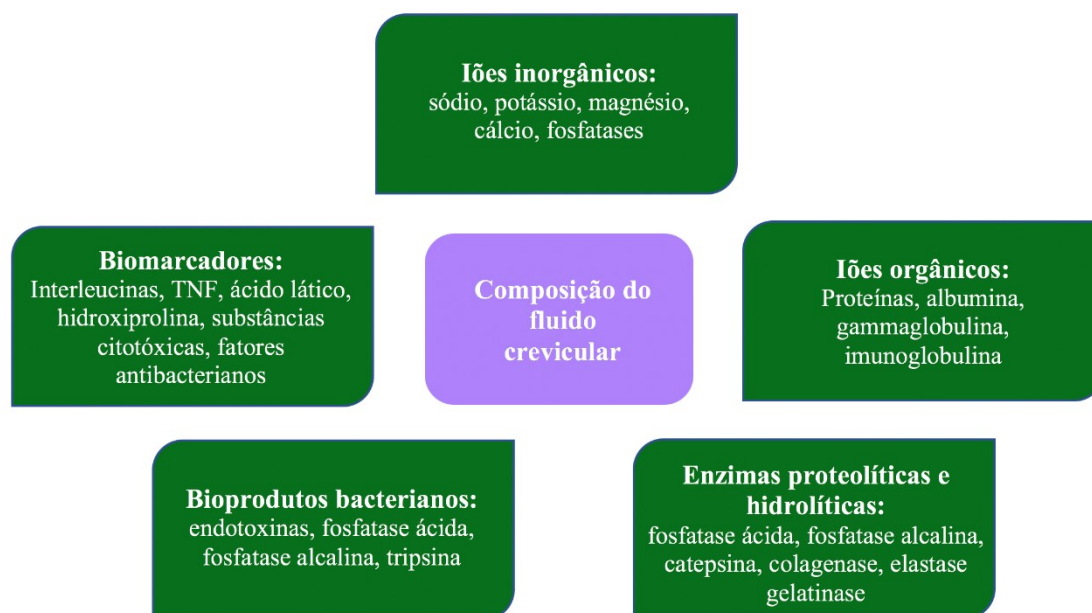
Existem várias opiniões sobre a denominação entre transudado ou exsudado para o fluido crevicular. Para alguns especialistas o fluido crevicular é um fluido fisiológico. Contudo, existem outros autores que defendem que o fluido crevicular é considerado um exsudado inflamatório (Barros et al., 2016). Desta dicotomia, ainda não ficou claro se o fluido crevicular se pode classificar como um transudado fisiológico ou um exudado inflamatório. Apesar do fluido ser considerado um exudado quando se verifica inflamação, mais recentemente surgiu a noção que também em situações de saúde ocorre migração de neutrófilos para o sulco (Barros et al., 2016).

#### 4.2. Composição

O fluido crevicular apresenta na sua constituição produtos de degradação dos tecidos, mediadores inflamatórios e ainda anticorpos direcionados à placa bacteriana, apresentando assim uma grande influência na defesa antimicrobiana do periodonto (Fatima et al., 2021)

Na sua composição podem existir bactérias tais como *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* (Barros et al., 2016).

Na composição do fluido existem: íons inorgânicos, íons orgânicos, enzimas proteolíticas e hidrolíticas, bioprodutos bacterianos e biomarcadores (figura 2) (Fatima et al., 2021).



**Figure 2;** Descrição da composição do FCG. Legendas: TNF- Fator de necrose tumoral. (adaptado de Fatima et al., 2021)

Durante o processo inflamatório o volume do fluido aumenta, ficando a sua composição semelhante à de um exsudado inflamatório. Assim, verificam-se mudanças significativas, no que diz respeito à composição do fluido, entre locais infetados e locais saudáveis (Fatima et al., 2021).

As células do EJ com as suas características de constante renovação, eliminação e substituição, constituem uma proteção contra bactérias invasoras. Durante o fenómeno da evolução da patologia, o fluido crevicular altera a sua composição, o seu pH, os níveis de oxigênio, a sua temperatura, a sua pressão osmótica, o potencial redox e como visto anteriormente aumenta significativamente o seu fluxo (Barros et al., 2016).

Assim torna-se claro que o aumento do ph conjuntamente com uma rica fonte de nutrientes, proveniente da constante destruição dos tecidos e da atividade metabólica bacteriana, levam à acumulação de amónia (NH<sub>3</sub>), favorecendo a proliferação de possíveis bactérias patogênicas sensíveis aos ácidos (Barros et al., 2016).

## **5. Recolha do Fluido Crevicular**

### **5.1. Métodos de recolha**

O fluido crevicular apresenta a vantagem de ser um biofluido facilmente obtido, que poderá ser válido na análise de biomarcadores imunológicos através de um método não invasivo e reprodutível. Desta forma, fornece uma informação específica e localizada, associado ao facto de que durante a evolução das patologias é notório um aumento do volume do fluido (Delucchi et al., 2023).

Atualmente existem vários métodos para a recolha de fluido:

- A lavagem gengival que consiste na irrigação do sulco gengival com uma solução isotónica de volume pré-determinado, por meio de duas agulhas de injeção. Estas agulhas são colocadas sobrepostas uma na outra, em que uma das agulhas é colocada no fundo do sulco e efetua a projeção da solução, enquanto a outra agulha é colocada mais ao nível da margem gengival, ficando responsável assim pela aspiração, captando a amostra que contém o fluido diluído. Apresenta, porém, limitações tornando impossível quantificar o volume exato de fluido recolhido como também o seu nível de diluição (Nazar Majeed, Philip, Alabsi, Pushparajan, & Swaminathan, 2016);

- Um outro método utilizado envolve a recolha através de micropipetas por absorção capilar, em que tubos capilares, “microcapillary pipette”, de diâmetro e comprimento definidos, são colocados nos sulcos gengivais, durante aproximadamente 5 a 20 minutos. Em casos de periodontite ativa o tempo é reduzido devido ao aumento substancial de volume do fluido. Posteriormente à colheita o conteúdo recolhido é centrifugado a 3000 rpm, durante 10 minutos, e guardado a temperatura inferior a 80 graus celcius, para uma posterior análise. Esta técnica apresenta a desvantagem de ser necessário algum tempo para ser captado um volume de fluido com quantia suficiente para análise. Esse tempo aumentado pode levar a um trauma dos tecidos. Uma outra desvantagem relaciona-se com a incapacidade da total captação de todo o fluido contido no microtubo (Subbarao et al., 2019);

- Uma outra técnica engloba a colocação de fios torcidos, previamente pesados na balança, os quais são colocados no sulco gengival à volta do dente ou implante (Subbarao et al., 2019). Após absorção do fluido pelo fio, estes são novamente pesados dando assim como resultado a quantidade de fluido produzido (Subbarao et al., 2019). Contudo, esta

técnica é limitada pois apenas permite a análise da quantificação do volume produzido no sulco, não permitindo o estudo da análise da composição do fluido (Subbarao et al., 2019);

- A técnica mais frequentemente usada é a de tiras ou cones de papel absorventes (Attar et al., 2018). Esta técnica consiste na utilização de tiras de papel de filtro colocadas nos sulcos ou bolsas, com uma inserção no sentido apical até ser encontrada alguma resistência (figura 3). Não se aconselha a sua introdução até ao final da bolsa, por perigo de contaminação sanguínea ou pelo risco das tiras se partirem ou desfazerem devido à saturação com o líquido. Sendo assim, as tiras devem ser inseridas até cerca de 1 a 2 milímetros de profundidade. Existe um outro método de utilização das tiras, onde estas são colocadas à entrada da bolsa, colhendo o líquido que transborda. Após o fluido ser absorvido a sua quantificação pode ser feita de diversas formas:

- i. Numa das formas, as tiras possuem a particularidade de serem banhadas em corante, como por exemplo a ninidrina, ou apresentarem marcação fluorescente, em que após a colheita do fluido, torna-se possível medir a área manchada com um microscópio graduado. No entanto, esta técnica apresenta alguma interferência na análise bioquímica da composição do fluido por interferência dos corantes utilizados (Subbarao et al., 2019);

- ii. Uma outra opção, é a que usa o método das tiras serem previamente pesadas na balança e novamente pesadas logo após a colheita do fluido (Subbarao et al., 2019);

- iii. Outra técnica utilizada recorre a métodos eletrônicos como é o caso do aparelho Periotron (figura 4). Esse instrumento mede as mudanças na capacidade de armazenamento de energia (capacitância) das tiras, convertendo em leitura digital, fornecendo assim informação quanto ao volume de fluido obtido (Subbarao et al., 2019);

Este método apresenta a vantagem de ser um método não invasivo, de fácil execução e apresentar boa captação do fluido. (Attar et al., 2018).



**Figure 3:** Colheita de FCG intracrevicular



**Figure 4:** Aparelho Periotron

## 5.2. Fatores que influenciam a recolha

Podem existir fatores que influenciem os resultados da análise do fluido crevicular, tais fatores como:

- a contaminação com sangue presente no sulco/ bolsa ou a contaminação com a saliva circundante. Assim sendo, no momento da colheita tem que existir um isolamento da área a examinar, havendo a necessidade de aplicação de ar, não se devendo apontar diretamente para o sulco gengival ou bolsa periodontal. Assim é aconselhado a utilização de rolos de algodão os quais permitem a obtenção de amostras sem estarem contaminadas. (Kinney et al., 2014).

- um outro fator prende-se com a possibilidade de existir perda de líquido por evaporação, resultando assim em erros na determinação de volume. Para evitar essa situação a tira deve ser armazenada num tubo apropriado, imediatamente após a recolha (Wassall & Preshaw, 2016);

- Uma recolha de mais ou menos tempo pode também influenciar a análise, sendo regularmente utilizado um tempo de 30 segundos (Wassall & Preshaw, 2016);

- A presença de biofilme também é um fator influenciador na recolha e análise, sendo que grandes depósitos de placa bacteriana devem ser cuidadosamente removidos antes da colheita (Wassall & Preshaw, 2016).

Atualmente existem diferentes possibilidades de métodos de análise dos biomarcadores presentes no fluido crevicular tais como: a técnica ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”), a técnica de ensaios imunofluorométricos (IFMA) em que nalguns estudos apresentou melhores resultados que a técnica ELISA embora tenha sido raramente utilizada (Delucchi et al., 2023).

Adicionalmente podem ser usadas outras técnicas como: a técnica kit de ensaio de atividade cathepsin-K activity, P-nitrophenyl-phosphate as substrate, técnica de substrato fluorogênico de baixo peso molecular, técnica de ensaio de uroquinase modificado, tecnologia de microarranjos de micro ácido ribonucleico (miRNAs), estando a seleção da técnica dependente do biomarcador alvo (Delucchi et al., 2023).

## 6. Definição de Biomarcador

Os biomarcadores são definidos por características biológicas, bioquímicas, fisiológicas que são mensuráveis e capazes de identificar processos fisiológicos ou patológicos, ou até mesmo respostas farmacológicas ou ainda capazes de intervir na abordagem terapêutica, bem como fornecer informações sobre o estado fisiológico de um organismo vivo (Torres Courchoud & Pérez Calvo, 2016).

Assistimos à existência de vários tipos de biomarcadores, caracterizando-se o ideal por ser específico, sensível, previsor, rápido, económico, não invasivo e estável *in vivo*, apresentar relevância clínica e pré-clínica que nos dê informação sobre a atividade e a progressão da doença (figura 5) (Gul et al., 2020).

A sua seleção requer uma cuidadosa consideração da sua especificidade e sensibilidade, exatidão, precisão, garantia de qualidade, procedimento analítico e

interpretação dos dados de medição, que devem ser comparados com outras variáveis (Gul et al., 2020).

A compreensão e avaliação da significância de um biomarcador pode ser útil na determinação da presença, diagnóstico, localização, progressão, prognóstico e atividade atual de uma doença (Yoshizawa et al., 2013).

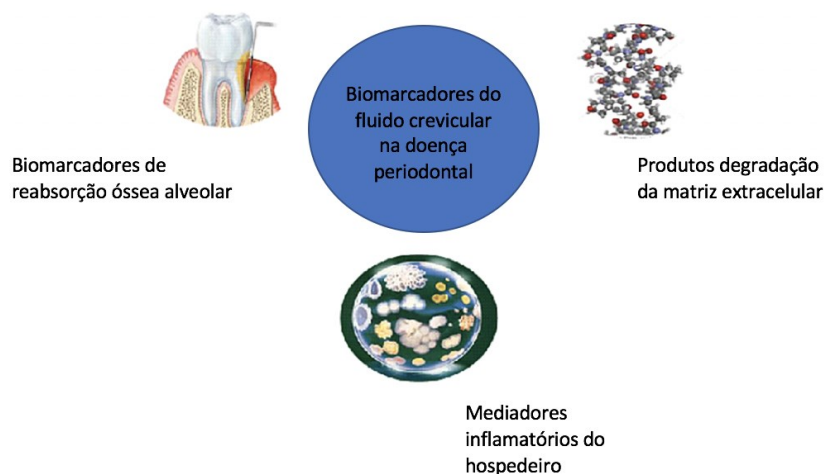


**Figure 5** :Critérios de um biomarcador ideal. Adaptado de (Gul et al., 2020)

## 7. Biomarcadores do fluido crevicular

Como foi visto anteriormente, o diagnóstico precoce e avaliação da progressão das patologias periodontais e peri-implantares ainda representam um grande desafio na prática clínica. Os biomarcadores analisados do FCG e do FCP, representam atualmente uma ferramenta de assistência na identificação do grau e estágio da doença (Alassy et al., 2019).

Os biomarcadores da doença periodontal normalmente são representados por moléculas relacionadas com 3 fases patológicas: a inflamação, a degradação da matriz extracelular e a reabsorção do osso alveolar (figura 6) (Shazam et al., 2020).



**Figure 6:** Tipos de biomarcadores orais na doença periodontal. Adaptado de (Shazam et al., 2020)

Atualmente, os biomarcadores analisados vão sendo cada vez menos, baseando-se a ciência em apurar uma maior evidência no resultado dos biomarcadores que têm tido uma maior influência e sucesso na detecção das patologias (Alassy et al., 2019).

Em seguida, serão abordados os biomarcadores relacionados com a inflamação, aqueles que resultam da degradação da matriz extra-celular e os que estão relacionados com a reabsorção óssea.

### 7.1. Biomarcadores Inflamatórios

#### • Fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ )

TNF $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória a qual participa na resposta inata do hospedeiro contra as bactérias periodontopatogénicas (Madureira et al., 2018).

Esta citocina atua estimulando a apoptose de fibroblastos e reduz a capacidade reparadora dos tecidos peri-implantares, aumentando também a reabsorção óssea por estimulação da formação de osteoclastos (Alassy et al., 2019).

#### • Prostaglandina E2 (PGE2)

A PGE2 é constituída por uma molécula frequentemente encontrada em locais de inflamação, derivada do metabolismo do ácido araquidônico, estando associada a mudanças no metabolismo dos fibroblastos, levando à destruição tecidual e reabsorção óssea (Kumar et al., 2013).

A PGE2 apresenta capacidade de induzir vasodilatação e permeabilidade capilar no paciente, o que provoca os sinais clínicos de edema e rubor, característicos da doença periodontal. Apresenta também capacidade de estimular o aumento do número de osteoclastos e conseqüentemente provocar reabsorção óssea. (Kumar et al., 2013).

• **Interleucinas (IL)**

○ **IL-1 $\beta$**

IL-1 $\beta$  é uma citocina pro-inflamatória responsável pelo início da resposta inflamatória que atua contra bactérias patogênicas periodontais, inflamação esta que leva ao aumento da expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), que por sua vez provoca a migração dos neutrófilos. A IL-1 $\beta$  atua como um forte estimulador de reabsorção óssea por ativação osteoclástica (Cheng, Wu, Li, Shao, & Hu, 2020).

○ **IL-8**

A IL-8 caracteriza-se por ser uma citocina com um papel tanto pro-inflamatório como anti-inflamatório. Como papel pro-inflamatório esta atua nos recetores das quimiocinas, promovendo a migração de múltiplas células imunes através do gradiente de concentração, facilitando a transição dos neutrófilos da vascularização gengival para as regiões inflamadas nos sulcos gengivais (Finoti et al., 2017).

A IL-8, como função anti-inflamatória, atua inibindo a adesão de leucócitos às células epiteliais (Finoti et al., 2017).

○ **IL-6**

A IL-6 tem como função a associação das respostas imunes inatas ou imunes adquiridas do hospedeiro, induzindo a diferenciação de células B ativadas em células produtoras de anticorpos, bem como em células T CD4+ (Alassy et al., 2019).

A sua presença foi demonstrada ser evidente na inflamação peri-implantar, conduzindo à ativação osteoclástica e conseqüente perda óssea peri-implantar (Alassy et al., 2019).

- **Proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1)**

A MCP-1 é um potente mediador responsável pelo recrutamento e ativação de monócitos para os locais com inflamação periodontal ativa.

Esta capacidade quimiotática de monócitos, aumenta com o aumento da inflamação (Gupta, Chaturvedi, & Jain, 2013).

- **SP**

A SP é um dos neuropéptidos mais abundantes envolvidos em múltiplos processos biológicos, incluindo a inflamação. É responsável por transmitir sinais de dor e tem também um papel regulador no sistema imune (Siddiqui et al., 2023).

Foi comprovada a sua existência em neurónios sensoriais, os quais possuem mecanismos reguladores da homeostase óssea, desempenhando assim um papel importante na regulação e remodelação óssea (Wang et al., 2022).

Existe evidência científica de que a atividade de nociceptores agrava a resposta inflamatória dos tecidos facilitando deste modo a perda óssea (Siddiqui et al., 2023).

Existe evidência que a perda óssea ocorre porque a SP estimula a osteoclastogênese, ativando o recetor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) e inibindo a OPG nos precursores de osteoclastos, nas células fibroblásticas sinoviais e na polpa dentária. Essas ações levam a maior exuberância da inflamação tecidual e a um estímulo da atividade osteoclástica com a consequente perda óssea (de Avila, de Molon, de Godoi Gonçalves, & Camparis, 2014).

## **7.2. Biomarcadores da degradação da matriz extracelular**

- **Elastase de neutrófilos**

A Elastase de neutrófilos é uma proteinase abundante libertada pelos grânulos primários dos neutrófilos, considerando-se assim um indicador da atividade dos neutrófilos (Alfakry, Malle, Koyani, Pussinen, & Sorsa, 2016).

Esta caracteriza-se por ser um fator de defesa do hospedeiro, no entanto a sua sobre-expressão pode levar à destruição de tecidos, através da degradação de elastina e

de colagénio tipo I e IV, afetando a barreira epitelial gengival e levando à expansão da infecção bacteriana (Hiyoshi et al., 2022).

### • **Metaloproteinases da matriz (MMPs)**

As MMPs são uma família de enzimas capazes de modelar componentes do tecido conectivo, sendo responsáveis pela degradação das fibras de colagénio e da matriz extracelular dos tecidos periodontais. São normalmente libertadas pelas células residentes como resposta à estimulação inflamatória, também colaborando na regulação de várias respostas imunes (Sapna, Gokul, & Bagri-Manjrekar, 2014).

As suas atividades são normalmente balanceadas por inibidores endógenos, como o inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP), sendo que qualquer oscilação nos seus níveis pode representar uma progressão da patologia (Sapna, Gokul, & Bagri-Manjrekar, 2014).

As MMPs mais relacionados com a patologia periodontal são maioritariamente da família das collagenases, apresentado a MMP-8 e a MMP-13 um papel preponderante, tendo as outras um papel pouco significativo na destruição do tecido periodontal (Sapna, Gokul, & Bagri-Manjrekar, 2014).

#### ○ **MMP-8: collagenase-2**

A MMP-8 é secretada por várias células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos, estando a sua elevada concentração associada à destruição tecidual (de Moraes et al., 2018).

Esta MMP, que faz parte da família das collagenases, tem a capacidade de degradação de colagénio tipo I, sendo este o tipo de colagénio presente em maior quantidade no periodonto. A MMP-8 apresenta assim a capacidade de degradação da matriz extracelular, promovendo a conversão de gengivite para periodontite (de Moraes et al., 2018).

É também entendido que, o aumento de MMP-8 nos fluidos orais precede a progressão da periodontite (Ghassib, Chen, Zhu, & Wang, 2019).

- **MMP-13: colagenase-3**

A MMP-13 é uma metaloproteinase que faz parte da família das colagenases, possuindo a capacidade de iniciar a reabsorção óssea, de ativar o pro-MMP-9 *in vitro*, tendo um papel importante na destruição tecidual da periodontite, uma vez que estimula a ativação de osteoclastos (Sapna et al., 2014).

- **MMP-9: gelatinase-B**

A MMP-9 faz parte da família das gelatinases, sendo esta maioritariamente segredada por leucócitos polimorfonucleares, os quais têm a função de degradar o colagénio tipo IV presente nos tecidos gengivais. A MMP-9 contribui assim para a completa degradação do colagénio desnaturado, facilitando também a migração de osteoclastos (Sapna et al., 2014).

### 7.3. Biomarcadores Ósseos

- **Fosfatase alcalina (ALP)**

A ALP é uma glicoproteína, produzida no periodonto e nos sulcos gengivais, por MMPs durante a inflamação, por macrófagos e por osteoblastos durante a formação óssea, e por fibroblastos do ligamento periodontal durante a regeneração periodontal (Malhotra, Grover, Kapoor, & Kapur, 2010). A ALP está presente durante os processos de inflamação e processos de regeneração e cicatrização (Malhotra, Grover, Kapoor, & Kapur, 2010).

Esta glicoproteína, tem a capacidade de hidrolisar ligações de éster em condições de pH básico, elevando os níveis de iões presentes no soro e no plasma do periodonto, apresentando um papel importante na cementogênese e na manutenção da hemostase óssea, estimulando a calcificação e atuando na fase de remodelação óssea (Shazam et al., 2020).

- **Osteocalcina**

A Osteocalcina é a proteína mais abundante na matriz extracelular óssea, sendo sintetizada por células do osso e da cartilagem, nela encontrando-se resíduos do ácido glutâmico. a osteocalcina conecta-se com os iões de cálcio presentes na rede cristalina de

hidroxiapatite do osso, sendo desta forma reconhecido como um marcador de formação óssea. Tem ainda como função recrutar osteoclastos para locais de reabsorção óssea (Shazam et al., 2020).

• **RANKL**

O RANKL é uma citocina que atua como um regulador genético e ligando para o recetor RANK (Yucel-Lindberg & Båge, T, 2013).

Atua ligando-se ao RANK levando à diferenciação e proliferação de osteoclastos, promovendo assim a atividade osteoclástica e consequente reabsorção óssea. (Hernández et al., 2020).

• **OPG**

A OPG é responsável pela regulação da reabsorção óssea, devido à sua elevada afinidade ao RANK, tendo a capacidade de inibir a ligação RANK/RANKL (Hernández et al., 2020).

Com o bloqueio da ligação RANK/RANKL, a OPG interfere na atividade osteoclástica, consequentemente relacionando-se diretamente com a quantidade e severidade de destruição óssea (Hernández et al., 2020).

• **ICTP**

O ICTP é um indicador específico de destruição óssea alveolar. Atua ativamente na degradação de colagénio, sendo os seus níveis proporcionais à destruição do referido colagénio (Shazam et al., 2020).

É então sugerido como um candidato a biomarcador na previsão de perda óssea futura da patologia de doenças periodontais (Shazam et al., 2020).

• **NTx**

O NTX é um curto telopeptídeo que é libertado como um bioproduto de reabsorção óssea, funcionando deste modo como um biomarcador da reabsorção óssea (Hernández et al., 2020).

• **Osteopontina**

A osteopontina é uma glicoproteína encontrada em tecidos não mineralizados, tendo influência tanto na reabsorção como na remodelação óssea, além de estimular a

formação de dentina. Está também envolvida no recrutamento de células polimorfonucleares como resposta à infecção (Shazam et al., 2020).

• **Fosfatase ácida resistente a Tartarato (TRAP)**

A TRAP é uma metalofosfodiesterase que tem como função a participação na reabsorção óssea mediada por osteoclastos, sendo sobre expressada por estas células. É considerado um biomarcador para a reabsorção óssea (Baddam et al., 2021).

• **miRNA**

Os miRNA fazem parte de uma grande família de moléculas “non-coding” do ácido ribonucleico (RNA), com comprimento de cerca de 22 nucleotídeos, tratando-se de reguladores epigenéticos pós-transicionais que modulam a expressão genética (Micó-Martínez et al, 2021).

Estas moléculas têm sido identificadas como biomarcadores de diversas patologias, tais como cancro, diabetes, doença coronária, mas também em doenças inflamatórias autoimunes como a artrite reumatoide, a esclerose múltipla e o lúpus eritematoso sistêmico (Micó-Martínez et al, 2021).

O miRNA extracelular permanece estável na corrente sanguínea e em biofluidos, tais como a urina e a saliva, fazendo com que esta molécula seja um candidato ideal para servir de biomarcador para a deteção, diagnóstico e prognóstico de várias patologias, incluindo a periodontite (Micó-Martínez et al, 2021).

Uma expressão excessiva de miRNAs, provoca uma desregulação de múltiplos processos celulares envolvidos nas respostas imunes inatas, e imunes adaptativas, contribuindo para o desenvolvimento de doenças inflamatórias crónicas (Santonocito, Polizzi, Palazzo, & Isola, 2021).

Os miRNAs apresentam a capacidade de regular tanto a função de neutrófilos, como a sua migração a partir dos capilares sanguíneos para os tecidos inflamados. Esta ação é conseguida pela regulação da adesão dos neutrófilos e pela estabilidade das quimiocinas do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) (Santonocito et al., 2021).

Estas moléculas têm um papel fulcral na patogénese da periodontite, e a sua desregulação pode ser induzida por certos componentes bacterianos que fazem parte da placa bacteriana oral. Esta ação leva a que os sistemas imunes inato e adaptativo sejam

inefazes em contrariar a alteração microbiana ou que desenvolvam uma resposta catabólica excessiva (Santonocito et al., 2021).

Existem estudos que demonstram que nas amostras de biofluido colheito, o miRNA apresenta-se fácil de isolar e identificar pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR). Por estas razões pode ser um excelente candidato a ser utilizado como biomarcador devido à extração minimamente invasiva com os métodos de colheita de biofluidos. (Santonocito et al., 2021).

## **8. Evidência científica da associação de biomarcadores com a periodontite**

Foi efetuada uma pesquisa que teve como pretensão demonstrar qual a evidência científica atual dos biomarcadores mais relevantes associados à periodontite. Nessa pesquisa foi dada prioridade às meta-análises, revisões sistemáticas e estudos de revisão por apresentarem maior nível de evidência científica.

### **• Biomarcadores inflamatórios – Estudos clínicos:**

Um estudo realizado em 2013 por Gupta et al. teve como objetivo avaliar os níveis de MCP-1 no FCG de pacientes com periodontite e analisar também as possíveis alterações desses níveis ao longo do tratamento periodontal. O estudo englobou 45 pacientes, dos quais 30 eram portadores de periodontite e os restantes 15 saudáveis. Foi feita uma análise comparativa, a qual se destinou a averiguar os níveis de concentração de MCP-1 presentes no FCG, em pacientes com periodontite, comparativamente aos níveis de concentração de MCP-1 presentes no FCG de pacientes saudáveis. Verificou-se haver um aumento significativo dos níveis de MCP-1 no FCG de pacientes com patologia periodontal. Adicionalmente, foi feita uma avaliação dos níveis de MCP-1 presentes no FCG, avaliação esta que ocorreu anteriormente ao tratamento periodontal e outra que ocorreu 6 semanas após o tratamento. Os resultados obtidos, constataram que os níveis de MCP-1 encontrados no FCG sugeriram que este biomarcador pode vir a ser um confiável indicador do estado atual da periodontite.

Kumar et al. (2013) efetuaram um estudo clínico randomizado com o objetivo de analisar a possível correlação entre a severidade da doença periodontal e os níveis de concentração de PGE2 no FCG. O estudo envolveu 3 grupos de pacientes: pacientes

saudáveis; pacientes com periodontite e pacientes que haviam efetuado tratamentos periodontais prévios. O estudo constatou existir um aumento substancial na concentração de PGE 2 ao longo da progressão da doença periodontal. Verificou-se uma correlação positiva entre elevados níveis de PGE2 presentes no FCG e a inflamação periodontal, considerando-se assim que a PGE2 tem potencial em servir como um indicador da inflamação e destruição periodontal.

Um estudo, efetuado por Pani et al. (2021) teve como propósito comparar os níveis de IL-1 $\beta$  no FCG recolhido de tecidos gengivais de indivíduos com inflamação periodontal comparativamente com o FCG recolhido de tecidos gengivais de indivíduos saudáveis. Foi feita uma análise do FCG de 32 pacientes portadores de periodontite, e o estudo constatou uma forte associação entre os elevados níveis de concentração desta interleucina com o nível de severidade da destruição periodontal.

Num estudo efetuado em 2023 por Siddiqui et al. tentaram analisar o envolvimento da SP na periodontite, tanto na resposta inflamatória do hospedeiro à doença periodontal, como também a qual o papel da SP na perda óssea constatada na periodontite. Este estudo revelou que a SP foi identificada como um marcador precoce da inflamação gengival, em experiências com humanos portadores da inflamação periodontal. Foi também verificado altos níveis de SP no FCG de pacientes com periodontite quando comparados a pacientes saudáveis. Resultou adicionalmente deste estudo que a injeção de SP, na gengiva inflamada do paciente, é suficiente para aumentar a inflamação e a reabsorção óssea no periodonto do mesmo. Por outro lado, observou-se que o tratamento farmacológico contendo inibição local da SP na gengiva diminui o nível de perda óssea.

#### **• Biomarcadores inflamatórios – Estudos de revisão:**

Em 2017 Finoti et al. realizaram uma revisão sistemática e meta-análise com o objetivo de compilar a evidência existente sobre a análise dos níveis de IL-8 no FCG de pacientes com periodontite. A meta-análise procurou analisar os níveis de IL-8 no FCG de pacientes com ou sem inflamação periodontal. Os resultados mostraram-se antagônicos, tendo a revisão sistemática concluído que os níveis de IL-8 no FCG estavam aumentados nos portadores de periodontite. Contudo a meta-análise veio demonstrar o

oposto, estando os níveis de IL-8 no FCG de pacientes com periodontite diminuídos quando comparados aos níveis de IL-8 presentes o FCG de pacientes saudáveis.

Em 2018 Madureira et al. elaboraram uma revisão sistemática com o objetivo de avaliar o TNF $\alpha$  como um possível biomarcador, visando entender qual o seu potencial na elaboração do diagnóstico periodontal. Esta revisão incluiu 26 estudos clínicos, os quais vieram a demonstrar elevados níveis de TNF $\alpha$  presentes no FCG em pacientes com periodontite relativamente a pacientes saudáveis. A revisão permitiu-nos retirar as seguintes conclusões: o TNF $\alpha$  apresenta um elevado potencial para ser utilizado como um biomarcador, podendo vir a auxiliar na elaboração do diagnóstico periodontal. Contudo, constatou-se que apesar de ser um bom auxílio na elaboração do diagnóstico não o é na fase de monitorização dos resultados da terapia periodontal.

**• Biomarcadores da degradação da matriz extracelular - Estudos de Revisão:**

Uma revisão sistemática efetuada por de Moraes et al. (2018) teve como objetivo analisar a literatura científica, referente a uma eventual possibilidade da MMP-8 presente no FCG vir a representar um válido biomarcador no diagnóstico da periodontite. Esta revisão incluiu a análise de 6 estudos, tendo-se concluído que quanto maior a concentração de MMP-8 encontrada no FCG mais se revela agravada e avançada a patologia periodontal. É de salientar que também se tornou perceptível o aumento dos níveis de concentração de MMP-8 no FCG de pacientes com periodontite, relativamente a pacientes saudáveis. Assim concluiu-se que a análise dos níveis de concentração de MMP-8 no FCG poderá vir a ser um coadjuvante do diagnóstico periodontal.

Em 2022 Lurchian et al. realizaram uma revisão da literatura que teve como objetivo identificar qual a influência das MMPs presentes no FCG no diagnóstico e prognóstico da periodontite. Através da análise de vários estudos ficou demonstrado a significância das MMPs na periodontite, nomeadamente a MMP-8 a MMP-9 e a MMP-13. Constatou-se, desta revisão, que a análise dos níveis de MMP-9 e MMP-13 no FCG podem ser biomarcadores úteis na avaliação da progressão da periodontite. Observou-se também que os níveis de MMP-8 e MMP-9 encontrados no FCG estavam diretamente correlacionados com a atual atividade da doença periodontal. Adicionalmente, verificou-se diminuições nos níveis de MMP-8 presentes no FCG após o tratamento periodontal. Além disso foram comprovadas correlações positivas entre a presença de altos níveis de

MMP-8 e MMP-9 no FCG e a severidade da doença periodontal. Desta revisão concluiu-se que da análise dos níveis de MMP-8 presentes no FCG pode representar uma rápida e precisa ferramenta de diagnóstico da periodontite.

• **Biomarcadores Ósseos - Estudos clínicos:**

Baddam et al. em 2021 realizaram um estudo que teve como objetivo analisar os níveis de TRAP, presentes no FCG em condições de saúde e em condições de periodontite. Neste estudo foram englobados 30 pacientes, sendo 15 pacientes saudáveis e os outros 15 portadores de inflamação periodontal. Os resultados relataram que os níveis de TRAP encontrados no FCG de pacientes doentes eram substancialmente superiores aos níveis de TRAP encontrados no FCG de pacientes saudáveis.

Concluimos, desta forma que o TRAP pode ser um indicador plausível da atividade e progressão da periodontite.

Em 2022 Rasaei et al. realizaram um estudo clínico que teve a finalidade de comparar a quantidade de ALP presente no FCG de pacientes com periodontite relativamente a pacientes saudáveis. O estudo abrangeu um total de 23 pacientes com periodontite e 23 pacientes saudáveis. O estudo demonstrou que os pacientes com periodontite apresentavam um elevado nível de concentração de ALP no FCG, o que levou a concluir que esta enzima pode vir a servir como indicador no diagnóstico precoce da periodontite. A análise revelou também que os níveis de ALP podem se revelar úteis, para monitorizar a extensão da lesão, bem como avaliar a resposta aos tratamentos, particularmente nos estados iniciais da patologia.

• **Biomarcadores Ósseos - Estudos de Revisão:**

Em 2020 Shazam et al. procederam à realização de uma revisão da literatura a fim de pesquisar a importância de biomarcadores ósseos presentes no FCG, tanto no precoce como no correto diagnóstico de periodontite. Entre os biomarcadores ósseos analisados estavam: o ALP, a OPG, o RANKL, o ICTP, o NTX, a osteocalcina e a osteopontina. A evidência comprovou existirem elevados níveis destes biomarcadores no FCG, quando coincidentes com casos ativos de periodontite. Ficou assim demonstrado que estes constituem possíveis marcadores da reabsorção óssea característica da periodontite.

Uma revisão da literatura conduzida por Santonocito et al. em 2021 examinou o papel de miRNAs na periodontite. A revisão efetuada demonstrou que os miRNAs têm um potencial viável, tanto por razões de diagnóstico como de prognóstico da doença periodontal. Constatou-se na observação realizada, diferenças entre os níveis celulares de miRNA em tecidos periodontais infetados em comparação com tecidos periodontais saudáveis. No entanto, protocolos e critérios padronizados e precisos são necessários para se obterem resultados comparáveis e reprodutíveis. O estudo realizado refere que muitos miRNAs podem apresentar o potencial de se tornarem biomarcadores da periodontite. Embora ainda seja clinicamente difícil determinar um grupo de miRNAs que venham a servir como biomarcadores da periodontite. Contudo, o miRNA-21-3p tem-se mostrado ser um dos mais relevantes. Paralelamente o MiRNA-146 em associação com miRNA-155, também apresentaram possibilidades de virem a ser bons biomarcadores, visto que são importantes reguladores no sistema imune, promovendo assim a expressão de algumas citocinas tais como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e o RANKL, que por sua vez são indicadores de periodontite.

#### **• Vários biomarcadores na análise – Estudos clínicos**

Hernández et al. em 2020 elaboraram um estudo com o propósito de avaliar se os níveis dos biomarcadores MMP-8, TRAP-5 e OPG exibidos na análise do FCG podiam auxiliar na diferenciação entre pacientes com um periodonto inflamado e pacientes com um periodonto saudável. Dos 31 indivíduos que participaram neste estudo, 18 deles eram portadores de periodontite sendo os restantes 13 saudáveis. O estudo concluiu que a MMP-8, a TRAP-5 e a OPG apresentam um alto potencial na detecção de destruição periodontal. A MMP-8 revelou ser o mais preciso biomarcador, dos analisados, na detecção da doença periodontal.

#### **• Vários biomarcadores na análise – Estudos de revisão**

A revisão narrativa efetuada por Yucel-Lindberg & Båge em 2013 analisou os estudos existentes sobre os biomarcadores inflamatórios presentes no FCG e ainda quais os eventuais reflexos na doença periodontal. Observou-se uma clara correlação entre os parâmetros clínicos da periodontite e elevados níveis de concentração das citocinas TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, MCP-1, PGE2 e IL-1 $\beta$  no FCG de pacientes portadores de inflamação

periodontal. Tornou-se também perceptível desta revisão que as citocinas analisadas estão entre os mediadores pró-inflamatórios mais importantes, apresentando um papel na promoção da ativação osteoclástica. Desta revisão também se concluiu que em situações de periodontite ativa os níveis de OPG tendem a ser baixos, enquanto que os níveis de RANKL são elevados, apresentando assim uma relação RANKL/OPG elevada, daí ocorrer uma maior destruição óssea na sequência da falta de inibição osteoclástica.

AlRowins et al. em 2014 efetuaram uma revisão da literatura sobre os estudos que vieram a indicar possíveis biomarcadores da periodontite, presentes no FCG. A revisão efetuada incluiu estudos publicados entre 1999 e 2014. Concluiu-se que a ALP, a elastase de neutrófilos, a MMP-8, a MMP9, a MMP13, a IL1 $\beta$ , a IL-8, a SP, o TNF $\alpha$ , o MCP-1, o ICTP e a osteopontina são biomarcadores sensíveis e fidedignos na avaliação da presença de periodontite, da sua severidade e da monitorização da resposta dos pacientes aos tratamentos periodontais. No entanto, concluíram ser necessário um maior aprofundamento nos estudos sobre os biomarcadores analisados, a fim de poderem ser reconhecidos como possíveis coadjuvantes do diagnóstico periodontal.

Numa revisão da literatura publicada por Gupta et al. em 2015 efetuaram uma análise dos biomarcadores presentes no FCG, tentando investigar se mesmos podem ser utilizados como indicadores da presença de periodontite. A análise abrangeu os seguintes biomarcadores: MMP-8, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ . Concluiu-se que foram detetadas elevadas concentrações destes biomarcadores no FCG de pacientes com periodontite ativa.

Uma revisão efetuada por Fatima et al. em 2021 apresentou como objetivo descrever o FCG como um potencial biofluido oral útil na diferenciação entre o estado de saúde e doença periodontal. Esta revisão analisou estudos que sugeriram a MMP-8 e a IL-1 $\beta$  como os biomarcadores mais confiáveis na determinação da presença de periodontite. Embora os autores também tenham salientado correlações positivas entre os aumentos da IL-1 $\beta$  e da IL-6 no FCG em locais com hemorragia à sondagem e com profundidade de sondagem elevada. Contudo a revisão concluiu que devido à complexidade da etiopatogenia da doença periodontal será pouco provável identificar um único biomarcador que permita um diagnóstico preciso.

Blanco-Pintos et al. em 2023 efetuaram uma revisão sistemática e meta-análise com o objetivo de determinar a precisão de combinações de biomarcadores do FCG como

meio de diagnóstico de periodontite em indivíduos sistemicamente saudáveis. Nesta revisão foram avaliados diversos estudos que variaram com diferentes combinações de biomarcadores: IL-6 com MMP-8; IL-1 $\beta$  com IL-6; IL-1 $\beta$  com MMP-8; IL-1 $\beta$ , IL-6 e MMP-8. A revisão efetuada revelou que as combinações de múltiplos biomarcadores demonstraram resultados biológicos consistentes, mas com aplicabilidade clínica limitada. Assim a melhor combinação de marcadores seria fornecida pela combinação de menos marcadores possível, ou seja, de apenas 2 biomarcadores, com alto nível de precisão. A revisão concluiu deste modo que a combinação de uma citocina pró-inflamatória com uma anti-inflamatória pode vir a fornecer associações eficazes para o diagnóstico de periodontite.

Ghallab em 2018 efetuou uma revisão da literatura, com o objetivo de avaliar as evidências da literatura atual e destacar as direções futuras em relação ao potencial diagnóstico de biomarcadores no FCG e na saliva na doença periodontal. A revisão concluiu que a combinação de mais de um biomarcador poderia fornecer um diagnóstico mais específico do estado periodontal do paciente

## **9. Evidência científica da associação de biomarcadores com a peri-implantite**

Foi realizada uma pesquisa da literatura, que procurou dar resposta sobre quais os biomarcadores até à data mais relevantes, que possam ser usados como ferramenta de diagnóstico e prognóstico da peri-implantite. Foi dado mais ênfase às revisões sistemáticas, revisões narrativas e meta análises recentes.

### **• Biomarcadores inflamatórios – Estudos clínicos:**

Em 2015 Renvert et al. realizaram um estudo clínico com o objetivo de avaliar os níveis de citocinas pró-inflamatórias presentes em casos de peri-implantite não tratada. A análise do estudo foi realizada em 41 pacientes, tendo observado que elevados níveis de concentração de IL-1 $\beta$ , IL-8, e TNF $\alpha$  presentes no FCP estavam associados a localizações com elevada hemorragia à sondagem e ou com a presença de supuração.

• **Biomarcadores inflamatórios – Estudos de revisão:**

Uma revisão sistemática e meta-análise efetuada por Faot et al. em 2015 teve como objetivo clarificar duas questões clínicas: a primeira questão interroga se existe ou não uma maior prevalência de alguma citocina inflamatória específica no FCP em pacientes com peri-implantite e a segunda questão procura relacionar a medição da resposta inflamatória no FCP como possível previsor do desenvolvimento de peri-implantite. Esta revisão analisou estudos desde o ano 1996 a 2013, tendo concluído que as investigações tiveram como principal foco as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ . Constatou-se também que estas são as mais importantes na formação osteoclástica e reabsorção óssea. Desta análise ficou demonstrado haver aumentos significativos dos níveis de IL-1 $\beta$  e dos níveis de TNF $\alpha$  no FCP de locais peri-implantares, bem como em locais com mucosite periimplantar, quando comparados aos níveis evidenciados no FCP de locais saudáveis. Ficou evidenciando que o estudo dos níveis de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  presentes no FCP colhido de locais com inflamação peri-implantar, pode auxiliar na avaliação de um diagnóstico precoce da peri-implantite.

• **Biomarcadores da degradação da matriz extracelular - Estudos clínicos:**

Aleksandrowicz et al. em 2017 efetuaram um estudo com o intuito de avaliar os níveis de MMP-8 presentes no FCP obtido de pacientes com sinais clínicos de mucosite peri-implantar/peri-implantite e compará-los posteriormente com os níveis de MMP-8 presentes no FCP obtido de pacientes saudáveis. Foi documentado que os níveis de MMP-8 no FCP estavam significativamente aumentados em pacientes com peri-implantite, quando comparados com os níveis evidenciados no FCP de pacientes saudáveis. O estudo sugere que a monitorização dos níveis de MMP-8 no FCP, pode ser um bom auxiliador no diagnóstico da mucosite periimplantar/peri-implantite em estados precoces, previamente ao aparecimento de sinais clínicos. O estudo concluiu que esta descoberta pode vir a permitir a realização da terapia peri-implantar, mesmo quando a patologia ainda se encontra num estado latente, longe da ocorrência da destruição dos tecidos.

• **Biomarcadores Ósseos - Estudos clínicos:**

Um estudo realizado por Menini et al. (2019) analisou o papel dos miRNAs na suscetibilidade dos pacientes à doença peri-implantar. Neste ensaio clínico incluíram-se

7 pacientes, todos com a colocação de 2 implantes. Constatou-se que havia uma correlação entre os níveis de miRNA presentes no FCG, após 3 meses de cicatrização da colocação dos implantes, e os fenômenos clínicos observados aos 5 anos de acompanhamento. O miRNA mais envolvido na previsão de desfechos clínicos, como a profundidade de sondagem e a hemorragia à sondagem, revelou-se ser o miRNA-548. O miRNA-548 caracteriza-se por ser um regulador do equilíbrio entre a proliferação e apoptose celular. Deste modo o miRNA-548 provou ser fundamental no desenvolvimento de doenças degenerativas do tecido peri-implantar, sendo igualmente um dificultador na cicatrização de feridas. O estudo sugere que o miRNA possa ser útil na previsão de resultados clínicos consequentes à colocação de implantes e usados como biomarcadores para fins de diagnóstico e prognóstico da peri-implantite.

#### **• Vários biomarcadores na análise – Estudos de revisão**

A revisão sistemática realizada por Dursun & Tözüm (2016) teve como objetivo entender quais os biomarcadores presentes no FCP e dentro destes quais poderão ser utilizados para uma futura identificação de situações de inflamação peri-implantar. Foram incluídos e analisados 41 estudos, tendo a maioria destes analisado os biomarcadores IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , permitindo a esta revisão sistemática concluir que estas citocinas são atualmente as mais promissoras no diagnóstico de situações de peri-implantite. A análise incluiu estudos que avaliaram a influência das MMPs na peri-implantite, nomeadamente a MMP-8 e a MMP-13, tendo-se concluído que os seus níveis presentes no FCP apresentam uma correlação positiva com presença de inflamação peri-implantar. Em relação à PGE2 a evidência refletiu uma certa contradição acerca da sua correlação com a inflamação peri-implantar. Em que alguns estudos foi observada uma correlação positiva entre a profundidade de sondagem e os aumentos dos níveis de PGE2. Contrariamente, outros estudos, não revelaram diferenças entre os níveis de PGE2 na comparação de localizações saudáveis com localizações de peri-implantite. Em relação aos biomarcadores ósseos, nomeadamente a OPG, o RANKL o ICTP e a osteocalcina a análise de estudos evidenciou haver uma nítida correlação positiva entre o aumento dos seus níveis e a perda óssea patológica.

Uma revisão narrativa realizada por Alassy et al. em 2019 teve como objetivo resumir o conhecimento atual sobre os biomarcadores presentes no FCP, bem como avaliar a sua capacidade de auxiliar na elaboração do diagnóstico periodontal e ainda de prever a progressão da patologia. A revisão incluiu diversas investigações que estudaram uma variedade de biomarcadores. Estudos abrangeram tanto biomarcadores inflamatórios bem como biomarcadores da matriz extracelular e biomarcadores da reabsorção óssea.

Relativamente aos biomarcadores inflamatórios, estudos focalizaram-se essencialmente nas citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6. Quanto às citocinas IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , a revisão concluiu que a análise dos seus níveis presentes no FCP, pode vir a ser uma ferramenta de auxílio à elaboração do diagnóstico peri-implantar. Contudo, é mencionado serem necessárias mais investigações com o intuito de averiguar a validade da análise destes biomarcadores, como possíveis precursores da doença peri-implantar. Em relação à evidência de outras citocinas pro-inflamatórias, a IL-6 veio a revelar-se não ser o biomarcador ideal quando se comparam locais com inflamação peri-implantar e saudáveis. No entanto, foram demonstrados aumentos nos níveis de IL-6 na progressão de mucosite peri-implantar para peri-implantite. Alguns estudos analisaram os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6 antes e após o tratamento peri-implantar e observou-se haver diminuições nas suas concentrações com o tratamento.

Em relação aos biomarcadores da matriz extracelular foram analisados essencialmente as MMP-8, as MMP-9, as MMP-13 e a elastase de neutrófilos. Constatou-se se que a MMP-8 pode vir a ser um biomarcador promissor na deteção precoce de sinais de inflamatórios da peri-implantite. Relativamente à MMP9 e à MMP13, também foram analisadas por diversos autores, os quais concluíram que os seus níveis estão aumentados em locais associados a maiores perdas ósseas. Ainda a elastase de neutrófilos mostrou ter os seus níveis aumentados em casos de pacientes com peri-implantite quando comparado a pacientes saudáveis.

Por fim no que diz respeito aos biomarcadores ósseos foram analisados biomarcadores tais como a OPG, a RANKL e a osteocalcina, no entanto os resultados sobre a correlação dos seus níveis presentes no FCP e a presença de inflamação peri-implantar mostrou ser contraditória. Deste modo evidência atual revelou-se inconclusiva quanto à validade destes biomarcadores no diagnóstico peri-implantar.

Uma revisão sistemática efetuada por Delucchi et al. em 2023 teve como objetivo aprofundar o conhecimento atual sobre a análise dos biomarcadores no FCP, e qual a sua associação à peri-implantite. Esta análise debruçou-se sobre 9 artigos, a qual evidenciou haver uma nítida correlação positiva entre o aumento dos níveis dos biomarcadores MMP-8, MMP-9, MMP-13, ALP, NTx, elastase de neutrófilos e a IL-1 $\beta$  com a consequente perda óssea patológica. Podemos então concluir, que a análise dos níveis destes biomarcadores, pode ser um verdadeiro auxiliador na formulação de um futuro diagnóstico precoce da peri-implantite. Esta revisão veio também esclarecer que a MMP-9 pode ser vista como um pré-requisito no recrutamento de osteoclastos para locais de reabsorção óssea. Complementarmente a revisão considera que os miRNAs apresentam a possibilidade de vir a constituir uma ferramenta no diagnóstico e prognóstico da peri-implantite. Uma outra vantagem deste tipo de análise reside no poder das mesmas exercerem um papel fundamental numa abordagem médica mais personalizada e específica. Assim o médico pode realizar um acompanhamento mais rigoroso de pacientes reabilitados com implantes.

### III. Conclusão

O objetivo da análise do fluido crevicular no diagnóstico da periodontite e peri-implantite consiste na utilização de determinados biomarcadores que possam prever o desenvolvimento da patologia, antecipar a sua progressão para estádios severos e paralelamente permitir compreender melhor a fisiopatologia da doença. Esse tipo de análise irá permitir um diagnóstico acessível, precoce, específico, mensurável e realista adicionando informação objetiva aos métodos convencionais de avaliação nomeadamente clínico e radiológico. O uso da análise de determinados biomarcadores no fluido crevicular pode contribuir para uma melhor base para a realização de planos de tratamento, proporcionando também informações cruciais durante as fases de manutenção periodontal/ peri-implantar e monitorização da patologia.

O fluido crevicular apresenta-se então como uma ferramenta promissora oferecendo uma abordagem eficiente, acessível e não invasiva para medição dos biomarcadores na cavidade oral e permitindo identificar indícios de inflamação precoce e essencialmente prever quais os casos em risco de sofrer destruição tecidual futura, como também abrir novas portas à monitorização da evolução da doença e eventual resposta aos tratamentos efetuados. O seu estudo irá permitir o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas mais individualizadas e precisas à saúde oral.

Dos vários métodos de recolha, aquele que tem sido mais usado nos diversos estudos é a análise por tiras de papel, apresentando estes resultados mais constantes, consistindo numa técnica fiável, rápida, indolor e repetível. Essa técnica permite além disso uma análise dos vários componentes presentes no fluido.

A literatura tem-se debruçado sobre a análise de biomarcadores relacionados com a inflamação, degradação da matriz extra-celular ou marcadores da reabsorção óssea. De entre os biomarcadores analisados aqueles que demonstram maior evidência são a IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e as MMP-8 quer para a periodontite, quer para a peri-implantite. As diferenças existentes entre alguns estudos devem-se a divergências na técnica de recolha, no tipo de análise empregue, nos estádios diferentes de evolução da doença ou na presença de fatores locais ou sistémicos que influenciem a recolha. A evidência é maior do uso destes biomarcadores como elementos de prognóstico da periodontite do que ao nível da peri-implantite.

É, no entanto, necessário a elaboração de protocolos clínicos de colheita de fluido crevicular de forma a aumentar a especificidade e minuciosidade da técnica de recolha do fluido. É também importante a determinação dos tempos de recolha do fluido. Os métodos usados para recuperar biomarcadores raramente são descritos com detalhes suficientes que permitam a replicação da técnica. A padronização dos parâmetros acima mencionados é um requisito para se chegar a um consenso sobre a validade de um determinado biomarcador como ferramenta de prognóstico da doença.

Devido à natureza da doença periodontal e peri-implantar, um biomarcador individual pode não ser suficiente para refletir as alterações globais nos tecidos afetados. Por isso a análise de 2 ou mais marcadores para diagnosticar /monitorizar a patologia poderá ser mais vantajosa. Além disso, um único biomarcador pode ser facilmente influenciado por fatores sistémicos e locais.

Estas ferramentas revolucionárias levarão à poupança de tempo e poderão minimizar o erro humano ajudando assim a delinear planos de tratamento personalizados e obtendo melhores resultados. Contudo, o custo/benefício do uso destes biomarcadores deve ser calculado rigorosamente para evitar uma sobrecarga para o doente e para o sistema de saúde.

#### IV. Bibliografia

Alani, A., Kelleher, M., & Bishop, K. (2014). Peri-implantitis. Part 1: Scope of the problem. *British dental journal*, 217(6), 281–287.

<https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.808>

Alassy, H., Parachuru, P., & Wolff, L. (2019). Peri-Implantitis Diagnosis and Prognosis Using Biomarkers in Peri-Implant Crevicular Fluid: A Narrative Review. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 9(4), 214.

<https://doi.org/10.3390/diagnostics9040214>

Aleksandrowicz, P., Żelechowska, P., Agier, J., Starska, K., Kędzierski, K., Wysokińska-Miszczuk, J., & Brzezińska-Błaszczyk, E. (2017). Evaluation of Metalloproteinase-8 Levels in Crevicular Fluid of Patients with Healthy Implants or Periodontitis. *Mediators of inflammation*, 2017, 4920847.

<https://doi.org/10.1155/2017/4920847>

Alfakry, H., Malle, E., Koyani, C. N., Pussinen, P. J., & Sorsa, T. (2016). Neutrophil proteolytic activation cascades: a possible mechanistic link between chronic periodontitis and coronary heart disease. *Innate immunity*, 22(1), 85–99.

<https://doi.org/10.1177/1753425915617521>

Almehmadi, A. H., & Alghamdi, F. (2018). Biomarkers of alveolar bone resorption in gingival crevicular fluid: A systematic review. *Archives of oral biology*, 93, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.05.004>

AlRowis, R., AlMoharib, H. S., AlMubarak, A., Bhaskardoss, J., Preethanath, R. S., & Anil, S. (2014). Oral fluid-based biomarkers in periodontal disease - part 2. Gingival crevicular fluid. *Journal of international oral health : JIOH*, 6(5), 126–135.

Armitage G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology*, 4(1), 1–6.  
<https://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1>

Attar, N. B., Banodkar, A. B., Gaikwad, R. P., Sethna, G. D., Patil, C. L., & Simon, S. (2018). Evaluation of gingival crevicular fluid volume in relation to clinical periodontal status with perioptron 8000. *International Journal of Applied Dental Sciences*, 4(1), 68–71. <http://www.oraljournal.com/archives/2018/4/1/B/4-1-3>

Baddam, H., Vivekanandan, G., Kondreddy, K., Peddi, S., Chitnis, P. P., Singh, Y. P., & Tiwar, R. V. C. (2021). Evaluation of Gingival Crevicular Fluid and Serum Tartrate-resistant Acid Phosphatase Levels in Subjects with Clinically Healthy Periodontium and Chronic Periodontitis - A Clinico-biochemical Study. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 13(Suppl 2), S1275–S1279.  
[https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs\\_90\\_21](https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_90_21)

Bagavad Gita, J., George, A. V., Pavithra, N., Chandrasekaran, S. C., Latchumanadhas, K., & Gnanamani, A. (2019). Dysregulation of miR-146a by periodontal pathogens: A risk for acute coronary syndrome. *Journal of periodontology*, 90(7), 756–765. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0466>

Barros, S. P., Williams, R., Offenbacher, S., & Morelli, T. (2016). Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontology 2000*, 70(1), 53–64. <https://doi.org/10.1111/prd.12107>

Becker, S. T., Beck-Broichsitter, B. E., Graetz, C., Dörfer, C. E., Wiltfang, J., & Häsler, R. (2014). Peri-implantitis versus periodontitis: functional differences indicated by transcriptome profiling. *Clinical implant dentistry and related research*, 16(3), 401–411. <https://doi.org/10.1111/cid.12001>

Berglundh, T., Armitage, G., Araujo, M. G., Avila-Ortiz, G., Blanco, J., Camargo, P. M., Chen, S., Cochran, D., Derks, J., Figuero, E., Hämmerle, C. H. F., Heitz-Mayfield, L. J. A., Huynh-Ba, G., Iacono, V., Koo, K. T., Lambert, F., McCauley, L., Quirynen, M., Renvert, S., Salvi, G. E., ... Zitzmann, N. (2018). Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of clinical periodontology*, 45 Suppl 20, S286–S291. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12957>

Blanco-Pintos, T., Regueira-Iglesias, A., Seijo-Porto, I., Balsa-Castro, C., Castelo-Baz, P., Nibali, L., & Tomás, I. (2023). Accuracy of periodontitis diagnosis obtained using multiple molecular biomarkers in oral fluids: A systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical periodontology*, 10.1111/jcpe.13854. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13854>

Bosshardt D. D. (2018). The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. *Periodontology 2000*, 76(1), 43–50. <https://doi.org/10.1111/prd.12153>

Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of clinical periodontology*, 45 Suppl 20, S1–S8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>

Cheng, R., Wu, Z., Li, M., Shao, M., & Hu, T. (2020). Interleukin-1 $\beta$  is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review. *International journal of oral science*, 12(1), 2. <https://doi.org/10.1038/s41368-019-0068-8>

Coli, P., Christiaens, V., Sennerby, L., & Bruyn, H. (2017). Reliability of periodontal diagnostic tools for monitoring peri-implant health and disease. *Periodontology 2000*, 73(1), 203–217. <https://doi.org/10.1111/prd.12162>

de Avila, E. D., de Molon, R. S., de Godoi Gonçalves, D. A., & Camparis, C. M. (2014). Relationship between levels of neuropeptide Substance P in periodontal disease and chronic pain: a literature review. *Journal of investigative and clinical dentistry*, 5(2), 91–97. <https://doi.org/10.1111/jicd.12087>

Delucchi, F., Canepa, C., Canullo, L., Pesce, P., Isola, G., & Menini, M. (2023). Biomarkers from Peri-Implant Crevicular Fluid (PICF) as Predictors of Peri-Implant Bone Loss: A Systematic Review. *International journal of molecular sciences*, 24(4), 3202. <https://doi.org/10.3390/ijms24043202>

de Moraes, E. F., Pinheiro, J. C., Leite, R. B., Santos, P. P. A., Barboza, C. A. G., & Freitas, R. A. (2018). Matrix metalloproteinase-8 levels in periodontal disease patients: A systematic review. *Journal of periodontal research*, 53(2), 156–163. <https://doi.org/10.1111/jre.12495>

Dursun, E., & Tözüm, T. F. (2016). Peri-Implant Crevicular Fluid Analysis, Enzymes and Biomarkers: a Systemetic Review. *Journal of oral & maxillofacial research*, 7(3), e9. <https://doi.org/10.5037/jomr.2016.7309>

Fatima, T., Khurshid, Z., Rehman, A., Imran, E., Srivastava, K. C., & Shrivastava, D. (2021). Gingival Crevicular Fluid (GCF): A Diagnostic Tool for the Detection of Periodontal Health and Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(5), 1208. <https://doi.org/10.3390/molecules26051208>

Faot, F., Nascimento, G. G., Bielemann, A. M., Campão, T. D., Leite, F. R., & Quirynen, M. (2015). Can peri-implant crevicular fluid assist in the diagnosis of peri-implantitis? A systematic review and meta-analysis. *Journal of periodontology*, 86(5), 631–645. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.140603>

Finoti, L. S., Nepomuceno, R., Pigossi, S. C., Corbi, S. C., Secolin, R., & Scarel-Caminaga, R. M. (2017). Association between interleukin-8 levels and chronic periodontal disease: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine*, *96*(22), e6932. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000006932>

Fischer, N. G., & Aparicio, C. (2022). Junctional epithelium and hemidesmosomes: Tape and rivets for solving the "percutaneous device dilemma" in dental and other permanent implants. *Bioactive materials*, *18*, 178–198.

Ghallab N. A. (2018). Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: Review of the current evidence. *Archives of oral biology*, *87*, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.12.022>

Ghassib, I., Chen, Z., Zhu, J., & Wang, H. L. (2019). Use of IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and MMP-8 biomarkers to distinguish peri-implant diseases: A systematic review and meta-analysis. *Clinical implant dentistry and related research*, *21*(1), 190–207. <https://doi.org/10.1111/cid.12694>

Gul, S. S., Abdulkareem, A. A., Sha, A. M., & Rawlinson, A. (2020). Diagnostic Accuracy of Oral Fluids Biomarker Profile to Determine the Current and Future Status of Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, *10*(10), 838. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10100838>

Gupta, A., Govila, V., & Saini, A. (2015). Proteomics - The research frontier in periodontics. *Journal of oral biology and craniofacial research*, *5*(1), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.01.001>

Gupta, M., Chaturvedi, R., & Jain, A. (2013). Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) as an immune-diagnostic biomarker in the pathogenesis of chronic

periodontal disease. *Cytokine*, 61(3), 892–897.

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.12.012>

Hajishengallis G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 15(1), 30–44.

<https://doi.org/10.1038/nri3785>

Heitz-Mayfield, L. J., Aaboe, M., Araujo, M., Carrión, J. B., Cavalcanti, R., Cionca, N., Cochran, D., Darby, I., Funakoshi, E., Gierthmuehlen, P. C., Hashim, D., Jahangiri, L., Kwon, Y., Lambert, F., Layton, D. M., Lorenzana, E. R., McKenna, G., Mombelli, A., Müller, F., Roccuzzo, M., ... Yeo, A. (2018). Group 4 ITI Consensus Report: Risks and biologic complications associated with implant dentistry. *Clinical oral implants research*, 29 Suppl 16, 351–358. <https://doi.org/10.1111/clr.13307>

Hernández, M., Baeza, M., Contreras, J., Sorsa, T., Tervahartiala, T., Valdés, M., Chaparro, A., & Hernández-Ríos, P. (2020). MMP-8, TRAP-5, and OPG Levels in GCF Diagnostic Potential to Discriminate between Healthy Patients', Mild and Severe Periodontitis Sites. *Biomolecules*, 10(11), 1500. <https://doi.org/10.3390/biom10111500>

Hiyoshi, T., Domon, H., Maekawa, T., Tamura, H., Isono, T., Hirayama, S., Sasagawa, K., Takizawa, F., Tabeta, K., & Terao, Y. (2022). Neutrophil elastase aggravates periodontitis by disrupting gingival epithelial barrier via cleaving cell adhesion molecules. *Scientific reports*, 12(1), 8159. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12358-3>

Khurshid, Z., Mali, M., Naseem, M., Najeeb, S., & Zafar, M. S. (2017). Human Gingival Crevicular Fluids (GCF) Proteomics: An Overview. *Dentistry journal*, 5(1), 12. <https://doi.org/10.3390/dj5010012>

Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17038.

<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>

Kinney, J. S., Morelli, T., Oh, M., Braun, T. M., Ramseier, C. A., Sugai, J. V., & Giannobile, W. V. (2014). Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression. *Journal of clinical periodontology*, 41(2), 113–120.

<https://doi.org/10.1111/jcpe.12194>

Kitsuki, T., Yoshimoto, R. U., Aijima, R., Hatakeyama, J., Cao, A. L., Zhang, J. Q., Ohsaki, Y., Mori, Y., & Kido, M. A. (2020). Enhanced junctional epithelial permeability in TRPV4-deficient mice. *Journal of periodontal research*, 55(1), 51–60.

<https://doi.org/10.1111/jre.12685>

Kumar, A. K., Reddy, N. R., Babu, M., Kumar, P. M., Reddy, V. S., & Chavan, C. V. (2013). Estimation of prostaglandin E2 levels in gingival crevicular fluid in periodontal health, disease and after treatment. *Contemporary clinical dentistry*, 4(3), 303–306. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.118354>

Kumar S. (2019). Evidence-Based Update on Diagnosis and Management of Gingivitis and Periodontitis. *Dental clinics of North America*, 63(1), 69–81.

<https://doi.org/10.1016/j.cden.2018.08.005>

Madureira, D. F., Lucas De Abreu Lima, I., Costa, G. C., Lages, E. M. B., Martins, C. C., & Aparecida Da Silva, T. (2018). Tumor Necrosis Factor-alpha in Gingival Crevicular Fluid as a Diagnostic Marker for Periodontal Diseases: A Systematic Review. *The journal of evidence-based dental practice*, 18(4), 315–331.

<https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2018.04.001>

Mahato, N., Wu, X., & Wang, L. (2016). Management of peri-implantitis: a systematic review, 2010-2015. *SpringerPlus*, 5, 105. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1735-2>

Malhotra, R., Grover, V., Kapoor, A., & Kapur, R. (2010). Alkaline phosphatase as a periodontal disease marker. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research*, 21(4), 531–536. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.74209>

Martínez-Hernández, M., Reyes-Grajeda, J. P., Hannig, M., & Almaguer-Flores, A. (2023). Salivary pellicle modulates biofilm formation on titanium surfaces. *Clinical oral investigations*, 10.1007/s00784-023-05230-9. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00784-023-05230-9>

Mehrotra, N., & Singh, S. (2023). Periodontitis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing

Menini, M., Pesce, P., Baldi, D., Coronel Vargas, G., Pera, P., & Izzotti, A. (2019). Prediction of Titanium Implant Success by Analysis of microRNA Expression in Peri-Implant Tissue. A 5-Year Follow-Up Study. *Journal of clinical medicine*, 8(6), 888. <https://doi.org/10.3390/jcm8060888>

Micó-Martínez, P., Almiñana-Pastor, P. J., Alpiste-Illueca, F., & López-Roldán, A. (2021). MicroRNAs and periodontal disease: a qualitative systematic review of human studies. *Journal of periodontal & implant science*, 51(6), 386–397. <https://doi.org/10.5051/jpis.2007540377>

Nakamura M. (2018). Histological and immunological characteristics of the junctional epithelium. *The Japanese dental science review*, 54(2), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2017.11.004>

Nazar Majeed, Z., Philip, K., Alabsi, A. M., Pushparajan, S., & Swaminathan, D. (2016). Identification of Gingival Crevicular Fluid Sampling, Analytical Methods, and Oral Biomarkers for the Diagnosis and Monitoring of Periodontal Diseases: A Systematic Review. *Disease markers*, 2016, 1804727. <https://doi.org/10.1155/2016/1804727>

Núñez-Belmar, J., Morales-Olavarria, M., Vicencio, E., Vernal, R., Cárdenas, J. P., & Cortez, C. (2022). Contribution of -Omics Technologies in the Study of *Porphyromonas gingivalis* during Periodontitis Pathogenesis: A Minireview. *International journal of molecular sciences*, 24(1), 620. <https://doi.org/10.3390/ijms24010620>

Panayotov, I. V., Végh, A. G., Martin, M., Vladimirov, B., Larroque, C., Gergely, C., Cuisinier, F. J. G., & Estephan, E. (2023). Improving dental epithelial junction on dental implants with bioengineered peptides. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 11, 1165853. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1165853>

Pani, P., Tsilioni, I., McGlennen, R., Brown, C. A., Hawley, C. E., Theoharides, T. C., & Papathanasiou, E. (2021). IL-1B(3954) polymorphism and red complex bacteria increase IL-1 $\beta$  (GCF) levels in periodontitis. *Journal of periodontal research*, 56(3), 501–511. <https://doi.org/10.1111/jre.12850>

Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kebschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., Loos, B. G., ... Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*, 89 Suppl 1, S173–S182. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>

Ramenzoni, L. L., Lehner, M. P., Kaufmann, M. E., Wiedemeier, D., Attin, T., & Schmidlin, P. R. (2021). Oral Diagnostic Methods for the Detection of Periodontal Disease. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, *11*(3), 571.

<https://doi.org/10.3390/diagnostics11030571>

Rasaei, N., Ghadiri, A., Peighan, M., Rekabi, A., & Atashkar, N. (2022). Evaluation of alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid and saliva of patients with periodontitis and healthy individuals. *Journal of family medicine and primary care*, *11*(11), 6983–6987. [https://doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe\\_477\\_22](https://doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe_477_22)

Rathee, M., & Jain, P. (2023). Gingivitis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing  
Renvert, S., Widén, C., & Persson, G. R. (2015). Cytokine expression in peri-implant crevicular fluid in relation to bacterial presence. *Journal of clinical periodontology*, *42*(7), 697–702. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12422>

Santonocito, S., Polizzi, A., Palazzo, G., & Isola, G. (2021). The Emerging Role of microRNA in Periodontitis: Pathophysiology, Clinical Potential and Future Molecular Perspectives. *International journal of molecular sciences*, *22*(11), 5456. <https://doi.org/10.3390/ijms22115456>

Sapna, G., Gokul, S., & Bagri-Manjrekar, K. (2014). Matrix metalloproteinases and periodontal diseases. *Oral diseases*, *20*(6), 538–550. <https://doi.org/10.1111/odi.12159>

Schwarz, F., Derks, J., Monje, A., & Wang, H. L. (2018). Peri-implantitis. *Journal of periodontology*, *89 Suppl 1*, S267–S290. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0350>

Sgolastra, F., Petrucci, A., Severino, M., Gatto, R., & Monaco, A. (2015). Periodontitis, implant loss and peri-implantitis. A meta-analysis. *Clinical oral implants research*, 26(4), e8–e16. <https://doi.org/10.1111/clr.12319>

Shazam, H., Shaikh, F., & Hussain, Z. (2020). Bone Turnover Markers in Chronic Periodontitis: A Literature Review. *Cureus*, 12(1), e6699. <https://doi.org/10.7759/cureus.6699>

Siddiqui, Y. D., Nie, X., Wang, S., Abbasi, Y., Park, L., Fan, X., Thumbigere-Math, V., & Chung, M. K. (2023). Substance P aggravates ligature-induced periodontitis in mice. *Frontiers in immunology*, 14, 1099017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1099017>

Smeets, R., Henningsen, A., Jung, O., Heiland, M., Hammächer, C., & Stein, J. M. (2014). Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review. *Head & face medicine*, 10, 34. <https://doi.org/10.1186/1746-160X-10-34>

Subbarao, K. C., Nattuthurai, G. S., Sundararajan, S. K., Sujith, I., Joseph, J., & Syedshah, Y. P. (2019). Gingival Crevicular Fluid: An Overview. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 11(Suppl 2), S135–S139. [https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS\\_56\\_19](https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_56_19)

Tonetti, M. S., & Sanz, M. (2019). Implementation of the new classification of periodontal diseases: Decision-making algorithms for clinical practice and education. *Journal of clinical periodontology*, 46(4), 398–405. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13104>

Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case

definition. *Journal of clinical periodontology*, 45 Suppl 20, S149–S161.

<https://doi.org/10.1111/jcpe.12945>

Torres Courchoud, I., & Pérez Calvo, J. I. (2016). Biomarcadores y práctica clínica [Biomarkers and clinical practice]. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, 39(1), 5–8. <https://doi.org/10.4321/S1137-6627/2016000100001>

Vitkov, L., Singh, J., Schauer, C., Minnich, B., Krunic, J., Oberthaler, H., Gamsjaeger, S., Herrmann, M., Knopf, J., & Hannig, M. (2023). Breaking the Gingival Barrier in Periodontitis. *International journal of molecular sciences*, 24(5), 4544. <https://doi.org/10.3390/ijms24054544>

Wang, S., Nie, X., Siddiqui, Y., Wang, X., Arora, V., Fan, X., Thumbigere-Math, V., & Chung, M. K. (2022). Nociceptor Neurons Magnify Host Responses to Aggravate Periodontitis. *Journal of dental research*, 101(7), 812–820. <https://doi.org/10.1177/00220345211069956>

Wassall, R. R., & Preshaw, P. M. (2016). Clinical and technical considerations in the analysis of gingival crevicular fluid. *Periodontology 2000*, 70(1), 65–79. <https://doi.org/10.1111/prd.12109>

Yakar, N., Guncu, G. N., Akman, A. C., Pinar, A., Karabulut, E., & Nohutcu, R. M. (2019). Evaluation of gingival crevicular fluid and peri-implant crevicular fluid levels of sclerostin, TWEAK, RANKL and OPG. *Cytokine*, 113, 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.10.021>

Yoshizawa, J. M., Schafer, C. A., Schafer, J. J., Farrell, J. J., Paster, B. J., & Wong, D. T. (2013). Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), 781–791. <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-13>

Yucel-Lindberg, T., & Båge, T. (2013). Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert reviews in molecular medicine*, 15, e7. <https://doi.org/10.1017/erm.2013.8>