

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NO RECOBRIMENTO RADICULAR COM PROTEÍNAS DERIVADAS DA MATRIZ DE ESMALTE ASSOCIADO A ENXERTO DE TECIDO CONJUNTIVO

Trabalho submetido por
João Miguel Moreno Neves
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

setembro de 2025

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ANÁLISE DA VARIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NO RECOBRIMENTO RADICULAR COM PROTEÍNAS DERIVADAS DA MATRIZ DE ESMALTE ASSOCIADO A ENXERTO DE TECIDO CONJUNTIVO

Trabalho submetido por
João Miguel Moreno Neves
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Alexandre Santos

e coorientado por
Prof. Doutora Madalena Salema-Oom
Prof. Doutor José Maria Cardoso

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o Prof. Doutor Alexandre Santos, gostaria de expressar o meu profundo agradecimento por toda a sua dedicação constante, disponibilidade e exigência científica ao longo do desenvolvimento desta dissertação. Foi graças a si, que despertei o meu interesse pela Periodontologia. É uma honra ter conseguido contar com a sua orientação, que foi fundamental para o meu crescimento académico e pessoal.

Ao meu co-orientador, o Prof. Doutor José Maria Cardoso, reconhecer também por toda a sua colaboração e contributo neste projeto.

À minha co-orientadora, a Prof. Doutora Madalena Oom, deixo um agradecimento muito especial pelo seu apoio constante, rigor exímio e dedicação. Obrigado por toda a paciência e acompanhamento, tornando este percurso muito mais enriquecedor.

Ao Prof. Doutor Luís Proença, obrigado por estar sempre pronto a esclarecer qualquer dúvida e pelo total apoio na parte estatística desta investigação.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, por ter sido a minha segunda casa nestes cinco anos que passaram e a todos os funcionários e docentes que tornaram esta caminhada especial.

Aos meus pais, Sónia e Luís, obrigado por todo o apoio incondicional, por me transmitirem sempre os melhores valores e que carregarei para a vida, obrigado por me guiarem ao sítio onde estou hoje. Sonhámos com isto e fizemos acontecer.

Ao meu irmão Salvador, obrigado por fazeres parte da minha vida e de me dares tanto a nível pessoal.

Às minhas avós, agradeço por serem quem são, por toda a ajuda e carinho que sempre me deram, por toda a força, paciência, humildade, por todas as palavras de apoio, que acompanham silenciosamente cada página desta tese.

À Carolina, a minha colega de box, obrigado por toda a força e paciência para comigo nesta aventura. Foi um percurso inesquecível e certamente irá deixar saudades.

A todas os meus amigos e familiares que me acompanharam, quer tenha sido de perto ou de longe, o meu muito obrigado.

RESUMO

Objetivos: Esta investigação procurou avaliar o comportamento de dois biomarcadores inflamatórios, a interleucina-8 (*IL-8*) e o fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*), no fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes submetidos a cirurgia de recobrimento radicular periodontal através da técnica de retalho de avanço coronal (*CAF*) com enxerto de tecido conjuntivo autólogo (*CTG*), com ou sem aplicação coadjuvante de proteínas derivadas da matriz de esmalte (*EMD*). O perfil temporal destes biomarcadores poderá fornecer informações sobre as respostas inflamatórias associadas a cada abordagem de tratamento.

Materiais e Métodos: Incluíram-se 24 pacientes alocados em dois grupos: grupo teste (n=13) tratado com *EMD* e grupo controlo (n=11). Foram recolhidas 94 amostras utilizando tiras de papel em quatro momentos distintos durante o processo de cicatrização: após cirurgia (dia 0) e nos dias 7, 14 e 21. Os níveis de *IL-8* e *VEGF* foram quantificados utilizando kits *ELISA*. A análise estatística utilizou o teste não paramétrico U de *Mann-Whitney* nas comparações intergrupo e o teste de *Friedman*, para as comparações intragrupo.

Resultados: Constatou-se a ausência de diferenças estatisticamente significativa entre os dois grupos de estudo para os biomarcadores *IL-8* e *VEGF* nos dias 7 e 21, verificando-se, contudo, diferenças significativas no biomarcador *VEGF* no dia 14 (p=0,015), com o grupo teste a apresentar valores mais elevados.

Conclusão: De acordo com esta análise biomolecular, pressupõe-se que a utilização do *EMD* em cirurgia de recobrimento radicular pode contribuir para uma melhoria do processo de cicatrização e angiogénese. São necessárias mais pesquisas com uma maior amostra para sustentar e comprovar os resultados obtidos neste estudo piloto e obter conclusões definitivas e mais robustas.

Palavras-chave: Recessão gengival; *CAF*; *IL-8*; *VEGF*.

ABSTRACT

Objectives: This study aimed to assess the behavior of two inflammatory biomarkers, interleukin 8 (IL-8) and vascular endothelial growth factor (VEGF), in the gingival crevicular fluid (GCF) of patients undergoing periodontal root coverage surgery using the coronally advanced flap (CAF) technique with an autologous connective tissue graft (CTG), either with or without the application of enamel matrix derivative (EMD).

Characterizing the temporal dynamics of these biomarkers in GCF may offer valuable insights into the inflammatory and healing responses elicited by each treatment modality.

Materials and Methods: A total of 24 patients were enrolled and allocated into two groups: an test group (n=13) treated with EMD and a control group (n=11). In total, 94 samples were collected using paper strips at four time points during the healing period: post-surgery (day 0), and on days 7, 14, and 21. The concentrations of IL-8 and VEGF were measured using ELISA kits. Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney U test for between-group comparisons and Friedman's test for within-group comparisons.

Results: There were no statistically significant differences between the two study groups for the biomarkers IL-8 and VEGF on days 7 and 21. However, there were significant differences in the biomarker VEGF on day 14 ($p=0.015$), with the test group presenting higher values.

Conclusion: Based on this biomolecular analysis, it is assumed that the use of EMD in root coverage surgery may contribute to improved healing and angiogenesis. Further research with a larger sample is needed to support and confirm the results obtained in this pilot study and obtain definitive and more robust conclusions.

Keywords: Gingival recession; CAF; *IL-8*; *VEGF*.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1. Recessão gengival	13
1.1.1. Definição	13
1.1.2. Tratamento.....	15
1.1.3. Retalho de avanço coronal.....	16
1.2. Proteínas Derivadas da Matriz do Esmalte (PDME)	17
1.2.1. Origem	17
1.2.2. Composição	18
1.2.3. Aspectos clínicos, histológicos e moleculares	19
1.2.4. Associação de Proteínas Derivadas da Matriz de Esmalte na técnica de Retalho de Avanço Coronal + Tecido Conjuntivo	21
1.3. O Flúido Crevicular Gengival (FCG)	25
1.3.1. Definição	25
1.3.2. Composição	27
1.3.3. Mecanismo de Produção	28
1.3.4. Métodos de recolha	29
1.3.5. Variáveis que condicionam a recolha de FCG	31
1.3.6. Estimativa volumétrica	32
1.3.7. Armazenamento	33
1.3.8. Abordagem analítica	33
1.4. Biomarcadores para o diagnóstico periodontal	34
1.4.1. Enquadramento geral	34
1.4.2. Fatores que podem influenciar a sua expressão no FCG	35
1.4.3. Interleucina-8 (<i>IL-8</i>)	37
1.4.4. O Fator de Crescimento Vascular Endotelial (<i>VEGF</i>)	37

2. MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.1. Questão clínica elaborada de acordo com os critérios PICOST	41
2.2. Desenho do estudo	41
2.3. Objetivos do estudo	42
2.4. Grupos de estudo	42
2.5. Hipóteses de estudo	42
2.6. Participantes	44
2.7. Critérios de inclusão	44
2.8. Critérios de exclusão	44
2.9. Cronograma do estudo	45
2.10. Recolha de Fluido Crevicular Gengival e quantificação do seu volume	45
2.11. Análises laboratoriais	46
2.11.1. Protocolo de preparação das amostras	46
2.11.2. Protocolo de análise das amostras	46
2.11.3. Análise estatística dos dados	48
3. RESULTADOS	51
3.1. Quantificação dos valores de <i>IL-8</i>	51
3.2. Quantificação dos valores de <i>VEGF</i>	53
4. DISCUSSÃO	55
5. LIMITAÇÕES AO ESTUDO	59
6. CONCLUSÃO	61
7. PERSPETIVAS FUTURAS	63
8. BIBLIOGRAFIA	65
9. ANEXOS	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de produção do FCG. Adaptado do artigo de Subbarao et al., (2019)	28
Figura 2 – Cronograma do estudo	45
Figura 3 – <i>Periotron</i> ®, modelo 8010 (Clínica Dentária Egas Moniz)	45
Figura 4 – <i>Periopaper</i> ® a ser fixado na parte superior de um <i>Eppendorf</i> ®	46
Figura 5 – Colocação da amostra nos poços apropriados	47
Figura 6 – <i>Welwash</i> ® (<i>Thermo scientific</i>)	47
Figura 7A – Leitor de microplacas <i>Tecan Inifinite M Plex 200 Pro</i>	48
Figura 7B – Configuração do software para incubação	48
Figura 8A – Curva de calibração para a <i>IL-8</i>	48
Figura 8B – Curva de calibração para o <i>VEGF</i>	48
Figura 9 – Evolução temporal da concentração média de <i>IL-8</i> ($\mu\text{g/ml}$)	51
Figura 10 – Valores médios da concentração de <i>VEGF</i> ($\mu\text{g/ml}$) ao longo do tempo	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Elementos que compõem o FCG. Adaptado do artigo de Bibi et al., (2021)	28
Tabela 2 – Interpretação dos valores do <i>Periotron</i> ®. Adaptado do artigo de Attar et al., (2018)	33
Tabela 3 – Hipótese possíveis das variáveis primárias	43
Tabela 4 – Valores médios da concentração de <i>IL-8</i> ($\mu\text{g/ml}$) ao longo do tempo	51
Tabela 5 – Valores de p em diferentes intervalos de tempo para a <i>IL-8</i> numa comparação intragrupo	52
Tabela 6 – Valores de p em diferentes momentos temporais para a <i>IL-8</i> numa comparação intergrupo	52
Tabela 7 – Valores médios da concentração de <i>VEGF</i> ($\mu\text{g/ml}$) ao longo do tempo	53
Tabela 8 – Valores de p em diferentes intervalos de tempo para o <i>VEGF</i> numa comparação intragrupo	54
Tabela 9 – Valores de p em diferentes momentos temporais para o <i>VEGF</i> numa comparação intergrupo	54

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SIGLAS

CAF – *Coronally Advanced Flap* = Retalho de avanço coronal.

CAL – *Clinical Attachment Level* = Nível de inserção clínica.

CTG – *Connective Tissue Graft* = Enxerto de tecido conjuntivo.

DPF – *Double Papilla Flap* = Retalho de dupla papila.

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* = Ensaio de Imunoabsorção Enzimática.

FCG – Fluido Crevicular Gengival.

FGG – Enxerto gengival livre.

GTR – *Guided Tissue Regeneration* = Regeneração Tecidual Guiada.

HbA1c – Hemoglobina glicada.

IFMA – *Immunofluorometric Assay* = Ensaio de Imunofluorescência.

IGF-1 – *Insulin-Like Growth Factor-1* = Fator de crescimento semelhante à insulina-1.

IL-1 β – *Interleukin-1- β* = Interleucina-1- β .

IL-4 – *Interleukin-4* = Interleucina-4.

IL-6 – *Interleukin-6* = Interleucina-6.

IL-8 – *Interleukin-8* = Interleucina-8.

IL-9 – *Interleukin-9* = Interleucina-9.

IL-10 – *Interleukin-10* = Interleucina-10.

IL-12 – *Interleukin-12* = Interleucina-12.

JAC – Junção amelo-cementária.

KT – *Keratinized tissue* = Tecido queratinizado.

LPF – *Laterally Positioned Flap* = Retalho de posicionamento lateral.

MCAT – *Modified Coronally Advanced Tunnel Technique* = Técnica do túnel modificado de avanço coronal.

MIP-1 α – *Macrophage Inflammatory Protein-1- α* = Proteína inflamatória de macrófagos-1- α .

MMP8 – *Matrix Metalloproteinase-8* = Metalopeptidase de matriz-8.

PBS – *Phosphate-Buffered Saline* = Solução salina tamponada com fosfato.

PDGF – *Platelet-Derived Growth Factor* = Fator de crescimento derivado de plaquetas

PDME/EMD – Proteínas derivadas da matriz de esmalte / *Emdogain*®

PRF – *Platelet-Rich Fibrin* = Plasma rico em plaquetas.

PRGF – *Plasma Rich in Growth Factors* = Plasma rico em fatores de crescimento.

PS – Profundidade de sondagem.

PST – *Pinhole Surgical Technique* = Técnica *pinhole*.

RG – Recessão gengival.

STC – *semilunar flap* = retalho semilunar

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor- α* = Fator de necrose tumoral- α

TUN – *Tunnel Technique* = Técnica de túnel.

UA – Unidade arbitrária

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* = Fator de Crescimento Endotelial Vascular.

VISTA – *Vestibular Incision Subperiosteal Tunnel Access* = Técnica de acesso ao túnel subperiosteal.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Recessão gengival

1.1.1. Definição

A recessão gengival (RG) é uma condição mucogengival frequente. Corresponde à exposição da raiz dentária, onde a gengiva se desloca numa direção mais apical em relação à junção amelo-cementária (JAC) (Jepsen et al., 2018). É uma condição altamente prevalente, que afeta mais de três quartos da população mundial, com variações na distribuição geográfica, raça, etnia, cultura e até mesmo no local de residência (zonas rurais ou urbanas), o qual pode ter influência no acesso a serviços de saúde oral competentes (Yadav et al., 2023). Apesar desta enorme prevalência, é importante não superestimar a relevância clínica das recessões gengivais mais leves (geralmente ≤ 1 mm), visto que a esmagadora maioria destes casos é assintomática e não origina quaisquer problemas, sejam eles a nível estético ou funcional (Marschner et al., 2025).

Num estudo observacional transversal publicado em 2015 por Mythri, onde foram avaliados um total de 710 pacientes, foi verificado que 291 desses pacientes (40,98%) apresentavam recessão gengival. Os homens foram mais afetados, com 60,5% em comparação com as mulheres, que apresentaram valores na ordem dos 39,5%. Constatou-se que os dentes mais afetados, foram os incisivos mandibulares (43%), seguindo-se os molares maxilares (13,2%), os pré-molares mandibulares (12,2%), os incisivos e pré-molares maxilares (8,9%), os molares mandibulares (4,9%), os caninos maxilares (4,6%) e por fim os caninos mandibulares (4,3%). De facto, a recessão gengival é mais comumente observada na arcada mandibular, com 66% de prevalência, contra 34% em relação à arcada maxilar (Mythri et al., 2015).

A etiologia das recessões gengivais é multifatorial e inclui a existência de fatores precipitantes e predisponentes. Como fatores precipitantes surge a inflamação por placa, em que a acumulação de biofilme em áreas de difícil higienização está diretamente associada ao aumento da gengivite e conseqüentemente à prevalência e gravidade da recessão gengival. A presença contínua de placa promove uma inflamação crónica nos tecidos periodontais, resultando na degradação das fibras de colagénio e perda de inserção, que favorecem a retração da gengiva. Esta relação é agravada pela

bidirecionalidade do processo, onde a presença de recessão dificulta a higienização, o que intensifica a acumulação de placa e perpetua o processo inflamatório. Assim, o controlo rigoroso da placa é essencial tanto para a prevenção como para a monitorização da recessão gengival (Yared et al., 2006).

A escovagem traumática é um outro fator precipitante e o mais frequentemente associado à recessão gengival. As variáveis relacionadas à escovagem como a força aplicada, a duração, frequência, tipo de cerdas e técnica utilizada, apresentam possibilidade de estarem associadas ao desenvolvimento de recessão gengival (Rajapakse et al., 2007). Em consonância, nos estudos de Chrysanthakopoulos, observou-se que existe uma forte correlação entre a escovagem com escovas de dureza média e a presença de recessão gengival, evidenciando que tais hábitos, associados a má higiene oral e inflamação gengival, contribuem significativamente para a progressão da condição (Chrysanthakopoulos, 2011).

Os piercings orais, especialmente aqueles colocados na língua e lábios, estão associados a efeitos adversos significativos sobre os tecidos periodontais. Numa revisão sistemática conduzida por Difloe-Geisert et al., em 2024, foi demonstrado uma forte associação entre os piercings e a recessão gengival, em que se observou de forma frequente recessão gengival na superfície vestibular dos incisivos inferiores em indivíduos com *piercings* labiais, e na face vestibular dos dentes anteriores mandibulares em indivíduos com *piercings* linguais. Desta forma, o trauma mecânico repetitivo causado pelo contacto dos *piercings* com a gengiva, conduzem ao deslocamento apical da margem gengival (Difloe-Geisert et al., 2024).

Uma revisão sistemática publicada em 2023 por Llano-Pérula et al., constatou que a ortodontia pode representar um fator de risco para o desenvolvimento de recessões gengivais em situações de movimentação dentária agressiva. A avaliação cuidadosa do fenótipo gengival, da posição inicial dos dentes e da magnitude dos movimentos ortodônticos é essencial para prevenir efeitos colaterais indesejados (como a migração apical dos tecidos moles marginais) e promover um tratamento interdisciplinar eficaz (Llano-Pérula et al., 2023).

Relativamente aos fatores predisponentes, diversos são os fatores anatómicos e estruturais que podem aumentar a suscetibilidade ao desenvolvimento de recessões

gingivais, entre eles destaca-se a má posição dentária, sobretudo em caso de dentes vestibularizados rotacionados ou que apresentem uma extrusão acentuada. Estas alterações podem resultar numa inserção radicular fora dos limites do osso alveolar, favorecendo a ocorrência de deiscências ou fenestrações ósseas, que por sua vez comprometem o suporte dos tecidos moles e favorecem o surgimento de recessões. A espessura da tábua óssea vestibular também desempenha um papel fundamental, uma vez que quando fina, a presença de fenestrações ou deiscências se tornam mais comuns, reduzindo a proteção óssea dos tecidos periodontais e facilitando a exposição radicular. Embora a ausência ou diminuição da quantidade de tecido queratinizado (*KT*) seja um risco associado a recessão gengival, este risco pode ser mitigado em pacientes que mantêm uma higiene oral eficaz, o que prova que a presença de gengiva queratinizada é desejável, mas não estritamente essencial para a estabilidade periodontal. Por fim, a inserção inadequada dos frios labiais ou linguais, nomeadamente quando posicionados muito a coronal, podem exercer uma tração sobre a gengiva marginal, o que favorece a recessão gengival na região afetada (Mostafa & Fatima, 2022).

Quando há a exposição da raiz dentária, fatores como a hipersensibilidade, problemas estéticos e um risco aumentado de destruição, quer seja por cáries ou desgaste, pode originar lesões designadas como lesões cervicais não cariosas (Gennai et al., 2022), em que estas lesões podem proporcionar aos pacientes um receio subjetivo da possibilidade da perda dentária. (Marschner et al., 2025).

1.1.2. Tratamento

De entre algumas das técnicas cirúrgicas para recobrimento radicular destacam-se a técnica do enxerto gengival livre (FGG), enxerto de tecido conjuntivo subepitelial (*CTG*), retalho de posicionamento lateral (*LPF*), retalho de dupla papila (*DPF*), retalho semilunar (*STC*), regeneração tecidual guiada (*GTR*), retalho de avanço coronal (*CAF*), técnica de túnel (*TUN*), técnica de acesso ao túnel subperiosteal por incisão vestibular (*VISTA*) e técnica *pinhole* (*PST*) (Mostafa & Fatima, 2022).

A escolha da técnica vai depender de diversos fatores-chave como o número e tamanho do defeito de recessão gengival, assim como a quantidade e qualidade dos tecidos queratinizados, a altura e a largura das papilas interdentárias, a presença de um

freio tracionado, a profundidade do vestíbulo e as exigências estéticas e funcionais do paciente (Rasperini et al., 2011).

1.1.3. Retalho de avanço coronal

Em 1926, Norberg apresentou a técnica de retalho de avanço coronal (*CAF*) como uma abordagem terapêutica para recobrimento radicular de recessões unitárias ou múltiplas (Reddy & Manohar, 2024).

Recomenda-se a técnica *CAF* quando existe uma quantidade de *KT* de pelo menos 2 mm, abaixo da raiz exposta (Zucchelli & Mounssif, 2015). Nos últimos anos, devido à crescente preocupação estética dos pacientes, a *CAF* passou por diversas modificações, com o intuito de alcançar resultados mais previsíveis e estáveis (Cairo et al., 2008).

Numa revisão sistemática publicado por Chambrone & Tatakis em 2015, analisaram-se 41 estudos randomizados e controlados que avaliavam a técnica *CAF* no recobrimento radicular de recessões gengivais. Os resultados demonstraram que a *CAF* apresenta taxas de sucesso elevadas, a rondar valores muito perto dos 100%. Todos os estudos que foram incluídos, permitiram concluir que esta técnica permite obter uma diminuição da hipersensibilidade dentária sentida por parte dos pacientes, e resultados estéticos bastante positivos (Chambrone & Tatakis, 2015).

No entanto, certos fatores anatómicos podem limitar a sua aplicação clínica e a eficácia. Entre eles estão a ausência ou presença de uma quantidade muito reduzida (≤ 1 mm) de *KT* abaixo do defeito de recessão gengival (Cortellini & Pini Prato, 2012); perda de inserção clínica nas áreas interdentárias; presença de bolsas gengivais que se estendem até à mucosa alveolar; tração elevada do freio junto à margem do tecido mole; perda significativa da estrutura radicular; posicionamento vestibular da raiz; e vestíbulos com pouca profundidade (Stefanini et al., 2018).

Primeiramente são aplicadas as incisões iniciais, em que são realizadas duas incisões horizontais em bisel, com cerca de 3 mm de comprimento cada, uma do lado mesial e outra do lado distal da recessão. Estas incisões devem estar posicionadas a uma distância da ponta das papilas anatómicas igual à profundidade da recessão, com mais 1 mm adicional. Posto isto, passamos a colocar em prática as incisões verticais, a partir da extremidade das incisões horizontais, fazendo-se duas incisões oblíquas também em bisel,

que se estendem até à mucosa alveolar, criando um retalho de forma trapezoidal. A etapa que se segue será a elevação do retalho, no sentido apical, onde também as papilas cirúrgicas serão elevadas em espessura parcial. O tecido mole que se encontra abaixo da recessão é depois elevado em espessura total, até expor 3 mm de osso na zona da deiscência óssea. Para que o retalho possa depois ser deslocado em direção coronal sem tensão, é necessário remover todas as inserções musculares que estejam presentes na sua espessura. Por fim são colocadas duas suturas interrompidas no periosteio, na parte mais apical das incisões verticais e suturam-se depois as papilas cirúrgicas, garantindo que a margem do retalho de adapte com precisão e consistência sobre a convexidade subjacente da coroa (Stefanini et al., 2018).

Num ensaio clínico randomizado multicêntrico publicado em 2023 por González-Febles et al., os investigadores compararam a técnica *CAF + CTG* com a técnica *TUN + CTG* ao longo de 6 meses. Para isso, 30 pacientes foram alocados de uma forma randomizada entre os dois grupos. Verificou-se apenas um aumento significativamente maior de KT ($p = 0,001$) no grupo *TUN + CTG* ($1,4 \pm 1,4$ mm) comparativamente ao grupo *CAF + CTG* ($0,4 \pm 0,7$ mm). Os autores concluíram que ambas as técnicas cirúrgicas são semelhantes, não se verificando diferenças estatisticamente significativas, em termos de recobrimento médio da recessão ($p = 0,547$) e redução média de profundidade da recessão ($p = 0,462$), verificando-se na técnica *TUN + CTG* uma menor morbidade do paciente e um menor tempo de intervenção cirúrgica (44,5 minutos em média) em relação à técnica *CAF + CTG*, que apresentou um tempo mais elevado de 63,9 minutos em média (González-Febles et al., 2023).

1.2. Proteínas Derivadas da Matriz do Esmalte (PDME)

1.2.1. Origem

Em 1997, uma equipa de investigadores na Suécia liderada por Lars Hammarström, documentaram pela primeira vez na literatura, as proteínas derivadas da matriz de esmalte (PDME), como um agente capaz de modular a cicatrização dos tecidos, simulando os processos fisiológicos envolvidos na formação radicular (Hammarström, 1997).

Proveniente do esmalte embrionário suíno com aproximadamente 6 meses, as PDME baseiam-se na elevada semelhança entre as proteínas do esmalte de origem suína

e as humanas. Essa compatibilidade permite que o material atue, mimetizando os mecanismos naturais envolvidos na formação do cemento radicular, contribuindo para a regeneração do ligamento periodontal, promovendo a sua re inserção funcional (Casillas et al., 2015).

As PDME são fornecidas comercialmente sob a forma de um gel biológico, cuja composição inclui proteínas do esmalte de origem suína, alginato de propilenoglicol e água, sob o nome *Emdogain*®. Inicialmente foi desenvolvido pela *BIORA AB (Malmo, Suécia)* e é atualmente distribuído pela *Strauman Biologic Division*. É disponibilizado em seringas de 0,3 ml, caso seja utilizado para defeitos únicos ou 0,7 ml para defeitos múltiplos. Mais recentemente também surgiram formulações de 0,15 ml (Discepoli et al., 2019).

1.2.2. Composição

As principais proteínas da matriz de esmalte são conhecidas como amelogeninas, uma família de proteínas hidrofóbicas, que representam cerca de 95% do conteúdo proteico total do derivado. Estas proteínas têm a capacidade de se agrupar em estruturas supramoleculares, formando uma matriz extracelular insolúvel, que desempenha um papel fundamental na orientação da organização ultraestrutural dos cristais de esmalte durante a odontogênese. Os restantes 5% incluem uma outra variedade de proteínas, entre as quais se incluem a enamelina, ameloblastina e determinadas peptidases, que são igualmente importantes no processo de regeneração periodontal (Heng et al., 2015).

As amelogeninas podem exercer funções em dois níveis distintos: por um lado, atuam como um sistema biológico de libertação controlada, promovendo a difusão prolongada e contínua dos seus peptídeos bioativos; por outro, ao serem clivadas libertam produtos bioativos que interagem diretamente com as células-alvo (cementoblastos), desencadeando uma cadeia de sinalização molecular que ativa a expressão de fatores de crescimento, essenciais para a iniciação e manutenção de processos regenerativos (Lyngstadaas et al., 2009).

A dinâmica celular após a aplicação do *Emdogain*®, indica que a sua atividade biológica se estende por um período superior a duas semanas, tempo suficiente para que

as células responsáveis pela formação de cemento se movam em direção aos tecidos adjacentes e promovam a regeneração periodontal (Bosshardt et al., 2009).

No estudo clínico de Sculean et al., em 2002, foram selecionados 16 pacientes com defeitos intraósseos avançados ao redor de dentes aos quais foi aplicado *EMD*. Constataram que o *EMD* é detetável na superfície de raízes expostas ao final de 2 a 4 semanas após a intervenção cirúrgica periodontal, e em situações em que alguns desses dentes tiveram de ser intervencionados, procedendo à sua extração, ainda existiam resquícios de *EMD* nas superfícies radiculares ao fim de algumas semanas. As obtenções destes resultados suportam a ideia de que este tempo seja suficiente para que ocorra a recolonização das células do ligamento periodontal, inibindo a proliferação e o crescimento de células epiteliais aquando da regeneração periodontal (Sculean et al., 2002).

1.2.3. Aspetos clínicos, histológicos e moleculares

No estudo experimental de Yuan et al., em 2003, os resultados demonstraram que a proliferação e diferenciação de células podem ser afetadas de muitas formas e os seus valores verificarem-se superiores com a utilização de *EMD*. De uma forma mais específica, a adição do *EMD*, vai permitir que as células do ligamento periodontal se diferenciem, com a produção dos cementoblastos (Yuan et al., 2003).

Um estudo laboratorial *in vitro*, publicado por Palioto em 2004, procurou evidenciar a influência do *EMD* sobre os fibroblastos do ligamento periodontal. Comparou-se o *EMD* com um potente modulador da regeneração periodontal, o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (*IGF-1*). Constatou-se que tanto o *EMD*, como o *IGF-1*, assim como a combinação de ambos, estimularam a proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal (Palioto et al., 2004).

Em 2012, Al-Hezaimi conduziu um estudo experimental *in vivo*, cujo objetivo primordial era avaliar de forma histológica os tecidos gengivais e verificar se existiria ou não alguma alteração na espessura destes tecidos após 4 meses. Foram considerados 30 dentes, provenientes de 5 cães e distribuído por dois grupos, um grupo controlo e um grupo teste com a adição de *EMD*. Verificou-se que a espessura média do tecido gengival apresentou valores estatisticamente mais elevados no grupo teste ($p < 0,0001$), com valores

de $1,76 \pm 0,23$ mm contra $0,72 \pm 0,11$ mm do grupo controlo, evidenciando o conceito de que o *EMD* tem um efeito clínico positivo na espessura do tecido gengival (Al-Hezaimi et al., 2012).

No estudo animal de Maymon-Gil et al., em 2016, aplicado em animais ($n = 24$), distribuídos de forma equitativa por dois grupos, teve como objetivo avaliar o efeito do *EMD* na cicatrização. Os resultados demonstraram que o grupo tratado com *EMD* não teve efeito sobre a cicatrização nos dias 5 e 9, mas apresentou uma maior contagem de células endoteliais proliferativas e um aumento significativo do número de vasos sanguíneos, tanto no dia 5 ($p < 0,03$) como ao fim de 9 dias ($p < 0,001$). Em termos de área média de fibras de colagénio do tecido conjuntivo, foram observados valores mais significativos ao 9º dia ($p < 0,02$). Assim, foi demonstrado que o *EMD* promove a angiogénese, fibroplasia e formação de matriz extracelular, que conseqüentemente provoca uma melhoria na cicatrização de tecidos moles (Maymon-Gil et al., 2016).

Uma revisão sistemática de 2016 publicada por Barrozo et al., tentou comparar a técnica *CAF* com o uso de *EMD* (grupo teste) ou sem o seu uso (grupo controlo) no tratamento de recessões gengivais. Em todos os estudos revistos, os valores de ganho de KT foram superiores nos grupos em que se associou *EMD*, assim como a probabilidade de recobrimento completo, novo cimento e resultados estéticos mais satisfatórios (Barrozo et al., 2016).

Ardakani e seus colaboradores em 2019, compararam através do seu estudo experimental *in vitro*, o efeito do *EMD* com o efeito do plasma rico em fatores de crescimento (*PRGF*) e com o efeito da fibrina rica em plaquetas (*PRF*) na proliferação de fibroblastos gengivais, mas não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no processo de regeneração da zona intervencionada (Talebi Ardakani et al., 2019).

Num ensaio clínico randomizado controlado de boca dividida publicado em 2022 por Dias et al., foram avaliadas 32 recessões, distribuídas por dois grupos, de forma a constituir um grupo controlo e um grupo teste, com a adição de *EMD*. Verificou-se que o uso de *EMD* promoveu uma média de recobrimento radicular completo significativamente maior ($p = 0,01$), assim como uma redução significativa de ganho de KT, tanto no grupo controlo ($p = 0,003$), como no grupo teste ($p < 0,001$). O recobrimento

radicular médio também foi significativamente maior no grupo teste ($p = 0,01$), com cerca de 86% (Dias et al., 2022).

1.2.4. Associação de Proteínas Derivadas da Matriz de Esmalte na técnica de Retalho de Avanço Coronal + Tecido Conjuntivo

Com o aumento significativo das evidências científicas nos últimos anos, a associação entre o retalho de avanço coronal (*CAF*) e o enxerto de tecido conjuntivo (*CTG*), consolidou-se como a abordagem de referência, o *gold standard*, no tratamento das recessões gengivais classe I e II de *Miller* em defeitos únicos ou múltiplos (Zuhr et al., 2020), em que o enxerto pode receber fluxo sanguíneo quer do retalho, quer do perióstio adjacente, aumentando assim a possibilidade de sobrevivência. Apesar disso, podem surgir algumas desvantagens, como um efeito mais doloroso ou então pelo facto de por vezes ser necessário uma segunda cirurgia para reduzir a espessura e obter um resultado estético mais satisfatório (Berlucchi et al., 2002).

Os procedimentos com enxerto de tecido conjuntivo subepitelial, recolhidos normalmente da região lateral do palato, podem provocar um aumento da morbidade pós-operatória para o paciente (Burkhardt et al., 2015), sendo especialmente indicados em situações em que o retalho de avanço coronal, por si só, não é viável ou suficiente, nomeadamente devido a limitações anatómicas locais. Estes enxertos representam a opção preferencial quando o objetivo terapêutico é não apenas atingir um recobrimento radicular completo, mas também aumentar a espessura do tecido mole na zona tratada, promovendo uma estabilidade a longo prazo dos resultados obtidos. Adicionalmente são considerados a primeira escolha nos casos em que existe perda de inserção clínica a nível interproximal, uma vez que essa condição compromete a previsibilidade de outras técnicas mais simples, tornando necessário recorrer a abordagens que favoreçam a regeneração naquela zona (Zucchelli & Mounssif, 2015).

A terapia combinada refere-se à utilização simultânea de várias abordagens de tratamento destinadas à reconstrução de tecidos periodontais, visando a obtenção de efeitos aditivos. Essa abordagem pode resultar na incorporação de diversos princípios regenerativos. O uso de retalho de avanço coronal, por exemplo, quando combinado com enxerto de tecido conjuntivo, pode ser potencializado pelo uso das proteínas derivadas de

esmalte, gerando assim um novo estímulo aos tecidos, ativando processos e mecanismos essenciais para a regeneração periodontal, incluindo a formação de cimento, ligamento periodontal e osso alveolar, possibilitando um ganho a nível clínico de inserção. Desta forma, a escolha do tipo de intervenção nos procedimentos de recobrimento radicular, deve ser metuculoso e englobar uma avaliação cuidadosa das características clínicas, das técnicas disponíveis, das preocupações estéticas e das preferências do paciente. O sucesso da intervenção cirúrgica periodontal, está dependente da capacidade de criar um consenso entre estes diferentes fatores para se obter o resultado pretendido (Miron et al., 2016).

Em 2003, McGuire et al., conduziu um ensaio clínico randomizado controlado de boca dividida com 20 pacientes distribuídos por dois grupos, um grupo controlo (*CAF + CTG*) e um grupo teste com *CAF + EMD*. As únicas diferenças clínicas significativas verificadas entre os grupos foi a profundidade de sondagem, com o grupo teste a apresentar valores inferiores ($p = 0,030$). Deste modo, a associação do *EMD* ao *CAF* promoveu resultados de recobrimento radicular semelhantes ao *CAF + CTG*, mas sem morbidade associada e potencial dor referenciada pelos pacientes (McGuire & Nunn, 2003).

Igualmente num estudo, datado de 2003, McGuire & Cochran tentaram avaliar as alterações que o *EMD* provoca quando combinado com a técnica *CAF*. Verificou-se que existiu uma maior formação de cimento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar com o seu uso, avaliado por meio de análises histológicas em biópsias obtidas após o tratamento. Este estudo revelou percentagens de recobrimento radicular de 100% em 89,5% dos pacientes tratados com *CAF + EMD*, enquanto os pacientes tratados com *CTG* apresentaram apenas recobrimento radicular de 100% em 79% dos casos (McGuire & Cochran., 2003).

Em 2013, Roman e a sua equipa de investigadores avaliaram se a associação de *EMD* com *CTG* na técnica *CAF*, iria promover uma melhoria nos resultados de tratamento de recessões gengivais classe I e II de Miller. Cerca de 42 pacientes foram distribuídos por dois grupos, o grupo controlo sem *EMD* ($n = 21$) e o grupo teste com *CAF + CTG + EMD* ($n = 21$). Ambos os grupos apresentaram um recobrimento radicular médio final sem diferenças significativas ($p = 0,19$) no acompanhamento após 1 ano. Além disso, o recobrimento radicular completo foi mais significativo no grupo teste ($p = 0,275$) em 56,5% dos pacientes, em comparação ao grupo controlo com 70,6% dos pacientes. Estes

resultados revelaram que o *EMD* quando combinado com *CAF + CTG* não proporcionou benefícios estatisticamente significativos no tratamento de recessões gengivais de classe I e II de Miller, após 1 ano de acompanhamento (Roman et al., 2013).

Em 2015, Casillas et al. publicou um estudo que avaliou os impactos clínicos e estéticos da aplicação de *EMD* em associação com *CAF + CTG* em pacientes que apresentam recessões gengivais classe I e II de Miller. Os pacientes que foram submetidos a *CAF + CTG + EMD* constituíram o grupo teste ($n = 19$) e os pacientes submetidos apenas a *CAF + CTG* ($n = 19$), o grupo controlo. Foi observado valores de recobrimento radicular estatisticamente significativos na monitorização após um ano da intervenção cirúrgica ($p < 0,05$) para o grupo teste. Estes resultados sugerem que o *EMD* parece possuir benefícios clínicos adicionais quando combinado com *CAF + CTG* (Casillas et al., 2015).

EM 2019, Shirakata et al., demonstraram que o uso de *CAF + CTG + EMD* no tratamento de recessões apresentou resultados significativamente superiores em termos de redução da profundidade de sondagem ($p < 0,05$) e ganho no nível de inserção clínica ($p < 0,001$) num estudo animal. A formação de cimento também ela foi estatisticamente superior ($p < 0,01$) no grupo com *EMD*, apresentando valores de $3,20 \pm 0,89$ mm. Também no grupo teste, existiu uma regeneração periodontal completa mais significativa ($p < 0,05$) com valores de $0,54 \pm 0,73$ mm. O presente estudo apoia o uso de *EMD* em associação com a técnica *CAF + CTG* para a promoção da regeneração periodontal em defeitos isolados de recessão gengival. Como estes resultados foram obtidos de um modelo animal, a extrapolação direta destas conclusões para humanos deve ser feita com cautela, devido a diferenças anatómicas existentes e níveis da cicatrização distintos (Shirakata et al., 2019).

Numa revisão sistemática publicada por Chambrone et al. em 2019, observou-se que a *CAF + CTG* consegue um recobrimento radicular médio com valores entre 64,7% a 99,3%, enquanto se for feita a associação de *CAF + EMD* a este procedimento, estes valores sobem para um intervalo entre 70,5% a 95,1%. No que se refere à profundidade de recessão, também se verificaram diferenças significativamente maiores quando aplicado *EMD* ($p = 0,005$) no tratamento de recessões gengivais unitárias. Apesar destas diferenças, os autores deste estudo sugerem que a opção mais adequada para o

recobrimento de recessões gengivais unitárias, ponderando os resultados clínicos obtidos e o custo benefício, é a opção *CAF + CTG* (Chambrone et al., 2019).

Numa outra revisão sistemática publicada por Dai et al. em 2019, que avaliaram a eficácia da técnica *CAF*, no recobrimento radicular de dentes com defeitos de classe I e II de Miller, observaram que *CAF + CTG* resultou em valores significativamente melhores do que *CAF* isoladamente, em termos de recobrimento radicular completo ($p = 0,0006$) e largura de KT ($p = 0,04$). Os autores verificaram que a adição de *EMD* ao *CAF*, não conseguiu demonstrar diferenças significativas em termos de recobrimento radicular completo ($p = 0,21$) (Dai et al., 2019).

A revisão sistemática de Discepoli e da sua equipa em 2019, teve como objetivo comprovar se o *EMD* seria capaz de melhorar a quantidade de KT ao redor dos dentes, em pacientes com defeitos de recessão após cirurgia plástica periodontal para recobrimento radicular. Não se verificaram diferenças significativas ($p < 0,058$) entre o grupo *CAF* e o grupo *CAF + EMD*, assim como também não se verificaram diferenças significativas ($p = 0,7603$) ao compararem *CAF + CTG + EMD* com *CAF + CTG*. Concluíram assim que o *EMD* não adiciona benefícios aquando da sua associação (Discepoli et al., 2019).

Em 2019 Aydinyurt e seus colaboradores, publicaram um estudo onde pretendiam avaliar a associação do *EMD* ao *CAF* com a utilização de *CTG* e verificar se existiria um ganho na quantidade de recobrimento radicular em classes I e II de Miller, num acompanhamento de 12 meses. Após o período estipulado, ambos os procedimentos apresentaram uma percentagem de recobrimento radicular significativo ($p < 0,05$). Contudo, não se observaram diferenças significativas entre os grupos em termos de índice estético de recobrimento (*RES*) e de percentagem de recobrimento radicular completo ($p > 0,05$) (Aydinyurt et al., 2019).

Em 2020, numa investigação clínica conduzida por Mercado et al., com uma amostra de 80 pacientes, entre os quais se analisaram 144 dentes, alocados em 2 grupos, grupo teste com $n = 80$ dentes (*CTG + EMD*) e grupo controlo com $n = 64$ dentes (*CTG* isoladamente). Num acompanhamento de 3 anos no grupo teste, constatou-se que a profundidade média da recessão diminuiu significativamente ($p < 0,0001$) do início do estudo ($4,65 \pm 1,84$ mm) até aos 12 meses ($0,24 \pm 0,19$ mm). Aos 24 meses ($0,35 \pm 0,17$

mm) e aos 36 meses ($0,39 \pm 0,19$ mm), verificaram-se valores mais estáveis. Para o grupo controlo, também a profundidade de recessão diminuiu significativamente ($p < 0,0001$) com valores de $4,43 \pm 1,11$ mm para $0,32 \pm 0,32$ mm ao fim de 12 meses. Estes valores estabilizaram aos 24 meses ($0,39 \pm 0,43$ mm) e aos 36 meses aumentaram significativamente ($p < 0,0013$) com valores entre $0,39 \pm 0,43$ mm a $0,92 \pm 0,43$ mm. Em termos de ganho de KT, houve aumento em ambos os grupos de forma significativa ($p < 0,01$), com o grupo teste a apresentar valores de $1,38 \pm 0,24$ mm para $2,04 \pm 0,4$ mm e o grupo controlo a elevar também os seus valores de $1,31 \pm 0,2$ mm para $1,86 \pm 0,2$ mm. Aos 24 meses, o grupo teste apresentou valores mais significativos ($p < 0,0001$), a rondar os $2,40 \pm 0,23$ mm. Finalmente aos 36 meses, o grupo teste também verificou valores significativamente mais elevados ($p < 0,0001$), de $2,44 \pm 0,21$ mm. Deste modo, o recobrimento radicular e a quantidade de KT apresentam melhores resultados, aquando da adição de *EMD*, sendo estas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (Mercado et al., 2020).

Quando o *EMD* foi usado em associação com a técnica *CAF* no tratamento de superfícies radiculares expostas, observou-se no estudo de Meza Mauricio e seus colaboradores em 2021, uma redução estatisticamente significativa da recessão gengival ($p = 0,02$) e uma melhoria significativa ($p = 0,01$) ao nível de inserção clínica (*CAL*), após 6 meses de análise, comparativamente aos casos em que se utilizou apenas a *CAF*. No entanto, esse mesmo estudo mostrou que o uso de *EMD*, quer isoladamente quer combinado com *CTG*, não apresentou diferenças significativas ($p = 0,54$) no ganho de KT, não existindo vantagem adicional ao nível deste parâmetro (Meza Mauricio et al., 2021).

1.3. O Flúido Crevicular Gengival

1.3.1. Definição

O diagnóstico da periodontite está diretamente relacionado à presença de perda de inserção clínica, que representa a destruição das estruturas de suporte do dente, o que inclui o ligamento periodontal e o osso que envolve a raiz do dente. Esta perda é avaliada por meio de sondagem periodontal, e a sua deteção é crucial para diferenciar entre periodontite de outras condições gengivais, que não afetam estas estruturas de sustentação (Bibi et al., 2021). O grande problema que reside neste método, é que apenas mostram

aquilo que já foi destruído, ou seja, fornecem um passado da doença e não do que poderá vir a acontecer no futuro. É cada vez mais importante encontrar formas de diagnóstico que não só detetem a doença mais cedo, mas também ajudem a prever como ela poderá evoluir em cada caso. Uma dessas soluções poderá passar pela análise de um fluido, a que se dá o nome de fluido crevicular gengival (FCG) (Bibi et al., 2021).

O FCG é formado abaixo do revestimento epitelial do sulco gengival, e acumula-se naturalmente entre a gengiva e o dente. Pode ser recolhido sem qualquer dificuldade, sem causar dor ou desconforto e analisado para detetar biomarcadores relacionados com a inflamação e com a perda óssea (Barros et al., 2016).

Através desta análise, é possível identificar locais onde há inflamação ativa, perceber se há risco de agravamento, e até detetar os primeiros sinais de periodontite antes que ocorra destruição significativa. O FCG surge assim como uma ferramenta dos tempos modernos, muito útil para tornar o diagnóstico periodontal mais preciso, precoce e personalizado (Champagne et al., 2003).

O FCG foi identificado como tendo potencial valor diagnóstico há mais de sessenta anos, e os estudos sobre a forma como esse fluido é produzido tiveram início com os trabalhos de Brill e da sua equipa de investigadores (Brill & Krasse, 1958). A falta de padronização na recolha do FCG e a escolha de diferentes biomarcadores para a análise faz com que diferentes estudos obtenham resultados inconsistentes. Ainda não existe um consenso entre investigadores de quais os biomarcadores devem ser analisados. A composição do fluido varia entre indivíduos, através de fatores como o género sexual, etnia, uso de medicação, e alterações sistémicas como diabetes, que podem alterar os níveis dos biomarcadores e conduzir a diferentes resultados. As análises do FCG ainda dependem muito de técnicas laboratoriais complexas, exigindo tempo e equipamento especializado. Para que existisse uma aplicação clínica de rotina, seriam necessários kits simples e rápidos, mais económicos e fiáveis. Os recentes desenvolvimentos em testes de diagnóstico no local de atendimento (POC) avançaram significativamente para o uso futuro de fluidos orais, o que irá permitir testes mais precisos e rápidos, aprimorando o atendimento individualizado. Apesar disto, ainda se carece de validação em larga escala e estes testes apenas são direcionados para análise da saliva e não do FCG (Ghallab, 2018).

O FCG pode aumentar em resposta a uma reação inflamatória ou irritação da gengiva. Quando bactérias ou outros agentes causadores de doenças, se alojam na região subgengival, o organismo tende a desencadear uma resposta de defesa local do sistema imunitário (Gupta et al., 2018).

Existem duas teorias que sugerem a formação do FCG: (1) Teoria Vascular, descrita por Brill em 1958 e mais tarde por Egerberg em 1966, que defende o surgimento do FCG através de alterações na permeabilidade dos capilares sanguíneos sob o epitélio gengival, o que irá permitir a passagem de componentes do plasma para o sulco, processo este que se intensifica com a presença de inflamação gengival e que origina um tipo de fluido, ao qual damos o nome de exsudado inflamatório (Sanadi et al., 2020); (2) Teoria Osmótica, descrita por Alfano em 1974 e mais tarde por Pashley em 1976, defendem que o fluido que surge inicialmente no sulco não tem necessariamente origem inflamatória, mas sim, intersticial (Sanadi et al., 2020). Os produtos bacterianos de elevado peso molecular difundem-se através do epitélio gengival e chegam até à membrana basal, o que cria um gradiente osmótico que pode atrair fluidos e contribuir para a inflamação local. Como estas moléculas não conseguem ultrapassar facilmente essa barreira, ocorre a retenção de solutos, o que atrai água por osmose. Esse movimento de fluido eleva a pressão intercelular, promovendo a sua passagem para o sulco (Pashley, 1976). Assim, inicialmente o FCG é visto como um transudado (fluido sem sinais inflamatórios, em gengivas saudáveis), mas pode transformar-se num exsudado típico de inflamação quando há estímulo patológico persistente (Preianò et al., 2020).

Ao contrário da saliva que não têm especificidade de sítio, refletindo um consenso sobre o estado inflamatório de toda a cavidade oral, o FCG é secretado diretamente junto às estruturas periodontais, possibilitando uma monitorização mais localizada, individualizada e fiel dos indicadores biológicos associados à regeneração tecidual após tratamentos periodontais (Buduneli et al., 2024).

1.3.2. Composição

O FCG é um fluido biológico altamente dinâmico, cuja composição reflete o estado periodontal. Entre os seus vários constituintes (tal como descrito na Tabela 1), estão mediadores inflamatórios, citocinas, elementos celulares (como bactérias, leucócitos e células epiteliais) e enzimas inflamatórias e de degradação tecidual. A tudo

isto ainda se juntam compostos orgânicos (incluindo proteínas, imunoglobulinas e albumina) e compostos inorgânicos (como sódio, cálcio, potássio e fosfato) (Pranali, 2020).

Tabela 1 – Elementos que compõem o FCG. Adaptado do artigo de Bibi et al., (2021)

CATEGORIA	COMPONENTES
Biomarcadores inflamatórios	Interleucinas (<i>IL-1α</i> , <i>IL-1β</i>) e fator de necrose tumoral-alfa (<i>TNF-α</i>), ácido lático, hidroxiprolina, substâncias citotóxicas e fatores antibacterianos
Compostos inorgânicos	Na, K, Ca, Mg e Fosfatos
Compostos orgânicos	Albumina, gamaglobulina, imunoglobulinas
Enzimas proteolíticas e hidrolíticas	Fosfatase alcalina, catepsina G, Colagenase, elastase, β -glucuronidase e gelatinases
Produtos bacterianos	Endotoxinas, enzimas semelhantes à tripsina, fosfatase ácida, fosfatase alcalina, produtos semelhantes às prostaglandinas

1.3.3. Mecanismo de Produção

Estão envolvidos na produção do FCG dois mecanismos principais (conforme descrito na Figura 1): (1) aumento da pressão hidrostática nos capilares da microcirculação e (2) desimpedimento das junções entre células endoteliais, permitindo a passagem de fluido para o tecido circundante (Subbarao et al., 2019).



Figura 1 – Ciclo de produção do FCG. Adaptado do artigo de Subbarao et al., (2019)

Há diversos fatores que podem influenciar o fluxo do FCG, que é relativamente pequeno, com a produção de alguns microlitros por hora. Entre os estímulos locais, estão a inflamação gengival, mastigação dos alimentos mais duros, profundidade da bolsa, instrumentação subgengival, descamação epitelial, aplicação tópica de histamina, o pós-cirúrgico periodontal, procedimentos restauradores, mobilidade dentária, febre e até contaminação salivar, permitem intensificar o fluxo. É ainda de referir fatores sistêmicos como a ovulação e o uso de anticoncepcionais hormonais, que permitem induzir alterações consideráveis (Subbarao et al., 2019).

Em relação à influência do ritmo circadiano sobre o fluxo no FCG, analisaram-se no estudo de Günday em 2014, as possíveis variações volumétricas diárias com intervalos de 2 horas e as conclusões não constataram quaisquer diferenças significativas (Günday et al., 2014). Em contrapartida, outro estudo conduzido por Subbarao, em 2019, evidenciou um aumento progressivo entre as 6 e as 22 horas, seguindo-se uma redução já no período noturno (Subbarao et al., 2019).

1.3.4. Métodos de recolha

O FCG pode ser recolhido por mais que um método:

(1) Tiras de papel absorvente

O método mais indicado e preciso, e por isso, mais frequentemente utilizado são as tiras ou cones de papel absorventes. Antes de qualquer colocação das tiras, o local deve ser isolado com rolos de algodão, e caso exista placa supragengival, proceder à sua remoção, e o local deve ser seco delicadamente com o auxílio de um jato de ar (Pranali, 2020).

A recolha de FCG através deste método pode ser feita de três formas distintas: (i) Método extracrevicular, no qual as tiras são colocadas sob a região do sulco gengival, recolhendo o fluido que transborda, minimizando a irritação nos tecidos do epitélio sulcular ou juncional; (ii) Método intracrevicular superficial, onde as tiras de papel são posicionadas junto à entrada do sulco; (iii) Método intracrevicular profundo, em que se utiliza tiras de papel inseridas no interior do sulco gengival (Sanadi et al., 2020), em que a tira deve ser introduzida até encontrar uma leve resistência, que por norma deverá ser 1

a 2 mm de profundidade e aguardar neste local entre 30 a 60 segundos. Por norma o tempo mais utilizado é de 30 segundos, uma vez que períodos mais longos aumentam o risco de contaminação da amostra, quer seja por sangue, saliva ou até mesmo por placa bacteriana, e pelo risco das tiras se desfazerem devido à saturação com o fluído, influenciando a medição precisa do volume (Pranali, 2020).

Inicialmente, os investigadores utilizavam fragmentos de papel de filtro laboratorial, de vários tipos, cortados em diferentes tamanhos para a recolha do FCG. No entanto, verificou-se mais tarde, que a recuperação das proteínas presentes nas amostras variava significativamente de acordo com o papel de filtro utilizado (Wassall & Preshaw, 2016). Este problema veio a ser colmatado com o surgimento dos *Periopapers*®, umas tiras de papel de dimensões padronizadas, capazes de absorver um volume máximo, que pode variar entre 1,2 e 2 µl (Pranali, 2020).

(2) Fios torcidos pré-pesados

Neste método, um fio previamente pesado, é colocado no sulco gengival ao redor do dente. A quantificação de volume que se recolheu obtém-se pesando aquele fio que ficou a absorver fluído no sulco, subtraindo-se o peso que tinha inicialmente. A única desvantagem deste método, é que não permite o estudo da análise da composição do fluído, apenas permite a análise da quantificação do volume produzido no sulco (Subbarao et al., 2019).

(3) Tubos capilares ou micropipetas

As pipetas microcapilares de volume interno conhecido, são posicionadas na entrada do sulco gengival. Desta forma, o FCG é recolhido por capilaridade, para o interior do tubo. Como o volume da pipeta é conhecido, é possível calcular o volume que se recolheu com precisão, bastando para isso determinar a distância que o fluído migrou, obtendo uma amostra pura sem diluições (Sanadi et al., 2020). A pipeta deve permanecer em média por 10 minutos na entrada do sulco, em pacientes com periodontite. Em pacientes saudáveis, esse tempo pode acrescer e variar entre 30 e 50 minutos (Nazar Majeed et al., 2016). A grande dificuldade que persiste é a estabilização do tubo capilar neste local por longos períodos e garantir ao mesmo tempo uma recolha atraumática. Uma

outra complicação é a dificuldade de remoção completa da amostra do interior do tubo (Sanadi et al., 2020).

(4) Lavagem gengival crevicular

Consiste na irrigação do sulco gengival, com uma solução isotônica de volume pré-determinado a partir de uma seringa, que é depois aspirada. Este processo é repetido algumas vezes, de forma que a solução se funda com o FCG. Uma das suas grandes limitações é ser impossível quantificar o volume exato de fluido recolhido, sendo que também irá existir uma grande possibilidade de irritação gengival aquando da sua recolha (Nazar Majeed et al., 2016).

1.3.5. Variáveis que condicionam a recolha de FCG

Há vários os fatores limitantes, mas o principal é a pequena quantidade de fluido recolhido. Muitas das proteínas presentes no FCG estão em concentrações tão reduzidas, que ultrapassam os limites mínimos de deteção de vários testes laboratoriais, tudo isto sob uma exigência rigorosa, que acompanha todo o processo desde a recolha ao armazenamento (Buduneli et al., 2024).

O tempo necessário para a recolha do FCG constitui um fator crítico, sobretudo quando este se prolonga. A evaporação durante este processo é um problema relevante, afetando negativamente a precisão na determinação do volume recolhido (Tözüm et al., 2004). Este aspeto reveste-se de particular importância tendo em conta que os volumes obtidos são frequentemente inferiores a 0,5 µl (Sanadi et al., 2020).

Para minimizar esse tipo de interferência, é de extrema importância, que uma vez recolhida a amostra, a mesma seja transferida imediatamente para um tubo apropriado, de forma a preservar a integridade da amostra ou então que seja logo quantificado o volume com os métodos adequados (Tözüm et al., 2004).

Existe consenso entre a maioria dos investigadores de que, quando ocorre hemorragia durante a recolha, o *Periopaper*® fica com uma coloração vermelha evidente e a amostra deverá ser descartada. No entanto, em situações específicas, especialmente em locais com inflamação, pode ser observado uma discreta coloração avermelhada nas extremidades da tira, sem que esta comprometa a amostra. Nestes casos, desde que haja

evidente impregnação do *Periopaper*® por FCG, a sua utilização para análise laboratorial é considerada aceitável (Wassall & Preshaw, 2016).

1.3.6. Estimativa volumétrica

Para quantificar o volume de FCG absorvido pelo *Periopaper*®, surgiu o método eletrónico *Periotron*®, inicialmente o modelo 600, depois o 6000 e mais tarde o 8000 (Pranali, 2020).

O modelo mais recente é o *Periotron*® 8010 (*OraFlow Inc.* Nova York, EUA), que expressa os seus resultados em unidades arbitrárias (UA) e baseia-se na medição da capacitância elétrica da tira de papel húmida, fornecendo uma leitura digital (Ito et al., 2021).

O *Periotron*® opera com duas mandíbulas metálicas, entre as quais é colocada a tira de papel, funcionando como um condensador elétrico. Quando uma tira completamente seca é inserida, o sistema interpreta a ausência de fluido como capacitância nula, resultando numa leitura de zero. Por outro lado, a presença de humidade provoca alterações no campo elétrico entre os elétrodos, aumentando a capacitância de acordo com a quantidade de fluido absorvido (Fernández-Reyes et al., 2020).

Para que as medições sejam fiáveis, o dispositivo deve ser previamente calibrado, utilizando volumes líquidos conhecidos. Para esse fim, é recomendado pelo fabricante o uso de líquidos tais como água destilada, soro ou saliva. Habitualmente, recorre-se ao soro como solução padrão, uma vez que a sua viscosidade e características físico-químicas são semelhantes às do FCG (Pranali, 2020).

Ao interpretar os valores obtidos através do *Periotron*® (Tabela 2), é essencial traduzir esses resultados para o contexto clínico correspondente, permitindo uma correlação adequada entre a leitura do dispositivo e as condições reais observadas na cavidade oral (Attar et al., 2018).

Tabela 2 – Interpretação dos valores do *Periotron*®. Adaptado do artigo de Attar et al., (2018)

Leitura do <i>Periotron</i> ®	0-20	21-40	41-80	81-200
Nível de inflamação gengival	Saudável	Leve	Moderado	Grave

1.3.7. Armazenamento

As amostras de FCG recolhidas são por norma conservadas em tubos descartáveis esterilizados e armazenados em temperatura controlada (frio) até ao momento da análise laboratorial (Mohammed-Salih & Saloom, 2022).

O armazenamento em nitrogénio líquido, a uma temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, apresenta vantagens significativas em relação ao congelamento convencional a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Devido à temperatura extremamente baixa, este método minimiza reações oxidativas e interações com moléculas de água, preservando a integridade da amostra. Como resultado, é possível manter as amostras estáveis durante longos períodos, inclusivé por décadas, sem ocorrência de degradação, oxidação ou alterações enzimáticas, assegurando a fiabilidade das análises moleculares subsequentes. No entanto, a prática mais comum é o congelamento a -80°C por variadíssimas razões, quer sejam elas logísticas, operacionais, económicas e facilidade de utilização. (Barros et al., 2016).

1.3.8. Abordagem analítica

Atualmente existem diferentes alternativas para analisar os biomarcadores presentes no FCG, como a técnica *ELISA* (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e a técnica *IFMA* (*Immunofluorometric Assay*) que são as principais.

A técnica *ELISA* baseia-se na interação entre o antígeno (proteína alvo) e o anticorpo primário contra o antígeno de interesse. A presença do antígeno é confirmada pela catálise do substrato adicionado por anticorpos ligados a enzimas, cujos produtos podem ser detetados qualitativamente por inspeção visual ou quantitativamente por meio de leituras de absorvância. Esta técnica requer apenas um leitor de absorvância, acessível e comum em laboratórios. Os reagentes e consumíveis que utiliza estão amplamente

disponíveis no mercado. No entanto o seu tempo de execução é muito longo (entre 2 e 5 horas) e requer várias etapas (Hayrapetyan et al., 2023).

A técnica *IFMA* é uma técnica que utiliza anticorpos marcados com fluorocromos (substâncias fluorescentes) que se ligam a biomarcadores específicos (como por exemplo proteínas ou antígenos) em amostras biológicas, como tecidos ou células. Quando expostos à luz de um determinado comprimento de onda, esses fluorocromos emitem fluorescência, a qual deverá ser quantificada. Todo este processo também deverá rondar as duas horas de execução (Umeizudike et al., 2022).

1.4. Biomarcadores para o diagnóstico periodontal

1.4.1. Enquadramento geral

Torna-se importante encontrar determinados biomarcadores que sejam eficazes no diagnóstico periodontal e que sejam capazes de identificar a atividade atual da doença, diferenciar locais ativos de inativos, prever a progressão da doença e monitorizar a resposta à terapia periodontal (Slots, 2013).

A intensidade da inflamação periodontal influencia diretamente, tanto o tipo como a quantidade de mediadores inflamatórios presentes nos tecidos afetados (Hajishengallis & Korostoff, 2017). Assim, a gengivite, apresenta níveis mais reduzidos de biomarcadores inflamatórios, quando comparada com a periodontite. A baixa concentração desses biomarcadores dificulta muitas vezes a sua identificação precisa, tornando-os mais suscetíveis a variações no estado clínico geral do paciente ou contaminações da amostra de fluido, o que compromete a construção de um modelo diagnóstico robusto e fiável (Bibi et al., 2021).

É razoável admitir que a gengivite e a periodontite possam partilhar determinados biomarcadores de diagnóstico. No entanto, tendo em conta as diferenças na gravidade e no estágio da resposta inflamatória entre ambas as condições, não se pode assumir que todos os biomarcadores relevantes para a periodontite apresentem utilidade diagnóstica equivalente na gengivite (Hong et al., 2020).

Apesar de ainda ser prematuro depender exclusivamente dos biomarcadores para o diagnóstico da periodontite, estes mostram potencial para complementar os parâmetros

clínicos universalmente aceites e podem também ser utilizados na monitorização da progressão da doença periodontal (Sanadi, et al., 2020).

A utilização de biomarcadores no diagnóstico da periodontite já foi considerada no âmbito da sua classificação. No entanto, durante o último *World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions*, conduzido pela *American Academy of Periodontology* (AAP) e pela *European Federation of Periodontology* (EFP) em 2017 (Berglundh et al., 2018), a ausência de evidência científica na altura, impediu a sua integração no sistema classificativo oficialmente adotado (Buduneli et al., 2024).

Atualmente, observa-se uma tendência para a redução no número de biomarcadores analisados, com a investigação científica a centrar-se naqueles que demonstram maior relevância e consistência na deteção de patologias, com o objetivo de fortalecer a evidência em torno dos marcadores mais promissores (Alassy et al., 2019).

A adoção de tecnologias inovadoras, como a inteligência artificial, poderá vir a revelar-se com potencial de revolucionar a análise de dados complexos associados aos biomarcadores, tornando o diagnóstico mais rápido e possibilitando uma personalização mais eficaz das terapias. Estes progressos são fundamentais para reforçar a relevância dos biomarcadores na medicina de precisão e promover melhorias expressivas nos desfechos clínicos (Nunes et al., 2024).

1.4.2. Fatores que podem influenciar a sua expressão no FCG

Os fatores sistémicos devem ser tidos em consideração, uma vez que têm a capacidade de exercer uma influência sobre os biomarcadores no fluído crevicular gengival, sendo a diabetes e o hábito de fumar, ambos amplamente reconhecidos pela sua capacidade de modular a resposta inflamatória e afetar a homeostase periodontal. Estes fatores modificadores devem ser avaliados com cautela, visto que podem alterar a interpretação clínica e laboratorial nos resultados dos biomarcadores (Pasarin et al., 2023).

Em 2015, um estudo realizado por Mohamed et al., observou uma correlação positiva entre a hemoglobina glicada (HbA1c) e os níveis de citocinas pró-inflamatórias

(interleucina-6 (*IL-6*), interleucina-9 (*IL-9*), interleucina-12 (*IL-12*) e *TNF- α* , com um coeficiente de correlação de *Pearson* (0,27), valor este que foi estatisticamente significativo ($p = 0,02$), enquanto a correlação entre HbA1c e as citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-4 (*IL-4*) e interleucina-10 (*IL-10*) não foi estatisticamente significativo ($p = 0,33$), com um valor de correlação de *Pearson* (0,11). Estes resultados sugerem que a diabetes pode estimular um ambiente inflamatório mais intenso, agravando a resposta inflamatória periodontal (Mohamed et al., 2015).

Um estudo publicado por Sereti et al., em 2021, onde se incluíram 100 participantes distribuídos de forma equitativa entre dois grupos, o grupo controlo sem diabetes ($n = 50$) e o grupo teste com diabetes ($n = 50$), teve como objetivo identificar a influência da diabetes sob os biomarcadores. Os níveis de *IL-8* no grupo controlo foram de 225 pg/ml e no grupo diabético 220 pg/ml, não se verificando uma diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,433$). A título de interesse, para a metalopeptidase de matriz 8 (*MMP-8*), o grupo controlo apresentou valores de 38,3 $\mu\text{g/ml}$ e no teste um valor de 32,1 $\mu\text{g/ml}$, não sendo também este um valor significativo ($p = 0,538$). Desta forma não ficou totalmente comprovado a influência que a diabetes poderá ter sobre os biomarcadores (Sereti et al., 2021).

Em 2009, foi publicado um ensaio clínico por Gomes e sua equipa, onde se avaliou o efeito do tabagismo no volume de FCG. A amostra incluiu cerca de 42 pacientes fumadores e 21 não fumadores. As conclusões dos investigadores foi que os hábitos tabágicos afetam negativamente o volume de FCG em todos os momentos da análise, isto é, os não fumadores têm em média 0,59 μL e os fumadores têm 0,36 μL , sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Gomes et al., 2009).

Em 2004, também Bumm e a sua equipa de investigadores verificaram a influência do tabaco na expressão de biomarcadores e verificaram um impacto bastante significativo ($p < 0,001$) nos níveis basais de *IL-8* recolhidos do FCG. Os resultados foram apresentados no formato mediana e amplitude interquartil, sendo estes valores mais baixos (106 [33-173]) em fumadores em comparação aos pacientes que não eram fumadores (132 [74-270]). Concluindo-se que o facto de fumar atenua a resposta imune do hospedeiro, conduzindo a um comprometimento da imunidade inata e adaptativa (Bumm et al., 2024).

1.4.3. Interleucina-8

Diversas células do organismo, tais como monócitos, linfócitos, granulócitos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, hepatócitos, células mesenquimais e condrócitos, são capazes de sintetizar interleucina-8 (*IL-8*). Contudo, essa substância só é libertada em contextos de inflamação. Até mesmo as plaquetas dispõem de *IL-8* nos seus grânulos e conseguem libertá-la de forma rápida quando ocorre um processo inflamatório (Matsushima et al., 2022).

A *IL-8* destaca-se como uma citocina com capacidade quimioatraente e ativadora de neutrófilos em ambientes inflamatórios (Finoti et al., 2017). Mais tarde também se veio a descobrir que era igualmente quimiotática para células endoteliais, com um papel de extrema relevância na angiogênese (Matsushima et al., 2022). Esta molécula desempenha dois papéis principais: promove a quimiotaxia, direcionando células-alvo para o local da infecção, e estimula a fagocitose. Para além disso, atua como um agente angiogénico significativo, contribuindo para a formação de novos vasos sanguíneos durante processos inflamatórios e de reparação tecidual (Dias et al., 2022). Por outro lado, a produção excessiva de *IL-8* pode resultar no recrutamento exacerbado e na migração desregulada de neutrófilos para os tecidos periodontais comprometidos, contribuindo para uma destruição acentuada da estrutura periodontal (Bumm et al., 2024).

Em 2017, Finoti e seus colaboradores, publicaram uma revisão sistemática acompanhada de meta-análise com o intuito de investigar as evidências disponíveis sobre os níveis da *IL-8* no FCG de indivíduos com periodontite. A meta-análise comparou os níveis de *IL-8* entre pacientes com inflamação periodontal e indivíduos saudáveis. Os resultados, no entanto, foram contraditórios. Enquanto na revisão sistemática os valores obtidos foram significativamente mais elevados em pacientes com periodontite ($p < 0,05$), na meta-análise demonstrou uma redução significativa ($p < 0,05$) destes níveis em indivíduos saudáveis. Estes resultados reforçam a complexidade e a variabilidade metodológica da *IL-8* entre os diferentes estudos considerados (Finoti et al., 2017).

1.4.4. O Fator de Crescimento Endotelial Vascular

O fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*), atua como um mediador multifuncional com papéis fundamentais na angiogênese, um processo complexo que leva

ao crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de células endoteliais diferenciadas, assim como na osteogênese. A elevação dos níveis de *VEGF* no FCG, pode refletir uma resposta adaptativa a uma disfunção vascular acentuada nos tecidos periodontais, bem como a expansão da rede microvascular associada ao processo inflamatório da periodontite (Afacan et al., 2019).

O *VEGF* desempenha um papel na promoção da proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais, contribuindo para a formação de novos vasos sanguíneos ao longo da embriogênese, do posterior desenvolvimento e dos processos de reparação tecidual (Kulakauskienė et al., 2020). Importa salientar que a expressão do *VEGF* é também modulada pela exposição a condições hipoxias. A redução da tensão de oxigênio nos tecidos estimula de forma persistente a síntese de *VEGF*, através da ativação da transcrição genética e da estabilização do respetivo mRNA (Nardi et al., 2020).

Existem sete subtipos diferentes de *VEGF*: *VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *VEGF-E*, *VEGF-F* e *PlGF*, entre os quais o *VEGF-A* assume um papel preponderante na promoção da vasculogênese e angiogênese e foi precisamente este subtipo que Kriauciunas et al. em 2024, avaliou na sua investigação para procurar comprovar esta hipótese, no entanto não obteve valores estatisticamente significativos ($p = 0,786$) (Kriauciunas et al., 2024).

No estudo de Tayman et al. em 2019, os resultados foram distintos, com o *VEGF-A* a apresentar resultados estatisticamente significativos ($p < 0,001$), provocando um aumento da permeabilidade vascular e da promoção da vasodilatação, assim como o recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão (Tayman et al., 2019).

As variações nos níveis de *VEGF-A* descritas na literatura, incluindo aumentos, reduções ou estabilidade, têm conduzido a resultados contraditórios entre diferentes estudos. Estas divergências podem ser atribuídas a múltiplos fatores, nomeadamente à presença de microrganismos periodontopatogénicos (Kriauciunas et al., 2024).

O *VEGF* tem emergido como um candidato relevante no contexto terapêutico da periodontite, dada a sua implicação em processos críticos, como a reabsorção óssea, angiogênese e regulação da imunidade inata. A sua atuação em diferentes vias patológicas confere-lhe potencial como biomarcador, com utilidade tanto na avaliação diagnóstica

como prognóstica da doença. No entanto, a validação definitiva da sua aplicabilidade clínica, requer ainda a realização de estudos multicêntricos que confirmem a sua eficácia e fiabilidade nestes contextos (Niklander et al., 2021).

Análise da variação de parâmetros bioquímicos no recobrimento radicular com proteínas derivadas da matriz de esmalte associado a enxerto de tecido conjuntivo

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Questão clínica elaborada de acordo com os critérios PICOST

P (Population) – pacientes portadores de recessões gengivais de Cairo RT1.

I (Intervention) – Foram realizadas duas intervenções cirúrgicas: retalho de avanço coronal com enxerto de tecido conjuntivo (*CAF + CTG*) ou com proteínas derivadas da matriz de esmalte (*CAF + CTG + EMD*).

Grupo controlo: *CAF + CTG*

Grupo teste: *CAF + CTG + EMD*

C (Comparison) – grupo controlo Vs grupo teste.

O (Outcome) – Quantificação dos níveis de *IL-8* e *VEGF* no FCG ao longo do tempo de cicatrização.

S (Study design) – Estudo clínico randomizado e controlado.

T (Timeframe) – Quatro meses.

De acordo com os critérios acima descritos, elaborou-se a seguinte questão foco PICOST: "Existem diferenças nos níveis dos marcadores *VEGF* e *IL-8* presentes no FCG após cirurgia de recobrimento radicular entre a técnica *CAF + CTG* e *CAF + CTG + EMD*?"

2.2. Desenho do estudo

A presente investigação é um estudo laboratorial que decorreu entre janeiro até abril de 2025, no *Molecular Biology LAB* da *Egas Moniz School of Health and Science*. Este estudo foi baseado num estudo clínico randomizado e controlado, grupo paralelo com randomização balanceada (1:1), mono-ocultação, de centro único, iniciado em Setembro de 2022 no âmbito de duas teses de mestrado integrado.

Foram analisadas 94 amostras, provenientes de 24 intervenções cirúrgicas, correspondentes ao dia da cirurgia, 7, 14 e 21 dias depois, armazenadas a -80°C , no *Molecular Biology LAB* da *Egas Moniz School of Health and Science*.

A análise do FCG foi realizada de forma cega, sem qualquer acesso aos detalhes dos pacientes submetidos às intervenções cirúrgicas.

O projeto de investigação foi aprovado pela Comissão de Ética da Egas Moniz School of Health and Science em fevereiro de 2024, tendo sido seguida a declaração de “Helsinki” revista em 2013. A aprovação teve o número de registo PT-255/23 e processo interno número 1358.

2.3. Objetivos do estudo

O principal objetivo desta investigação foi compreender como os dois biomarcadores em estudo (*VEGF* e *IL-8*) se comportam ao longo do tempo de cicatrização no FCG, em pacientes submetidos à cirurgia periodontal para recobrimento radicular, através da técnica *CAF* com autoenxerto de tecido conjuntivo palatino associado ou não às proteínas derivadas da matriz do esmalte (*Straumann®*, *Emdogain®*).

2.4. Grupos de estudo

Para esta investigação, totalizaram-se 24 intervenções cirúrgicas, constituindo-se dois grupos: Grupo A (grupo teste), com $n = 13$, em que a técnica cirúrgica foi *CAF + CTG + EMD* e Grupo B (grupo controlo), com $n = 11$, onde a técnica cirúrgica utilizada foi *CAF + CTG*.

2.5. Hipóteses do estudo

As hipóteses do estudo que possibilitam dar resposta aos objetivos propostos (Tabela 3) são:

- **H1.0** (nula) – Não existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de estudo relativamente ao biomarcador *IL-8* ao dia 7;
- **H1.1** (alternativa) – Existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de estudo relativamente ao biomarcador *IL-8* ao dia 7;
- **H2.0** (nula) – Não existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de estudo relativamente ao biomarcador *IL-8* ao dia 14;

- **H2.1** (alternativa) – Existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de estudo relativamente ao biomarcador *IL-8* ao dia 14;
- **H3.0** (nula) – Não existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de estudo relativamente ao biomarcador *IL-8* ao dia 21;
- **H3.1** (alternativa) – Existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de estudo relativamente ao biomarcador *IL-8* ao dia 21;
- **H4.0** (nula) – Não Existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de estudo relativamente ao biomarcador *VEGF* ao dia 7;
- **H4.1** (alternativa) – Existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de estudo relativamente ao biomarcador *VEGF* ao dia 7;
- **H5.0** (nula) – Não existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de estudo relativamente ao biomarcador *VEGF* ao dia 14;
- **H5.1** (alternativa) – Existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de estudo relativamente ao biomarcador *VEGF* ao dia 14;
- **H6.0** (nula) – Não existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de estudo relativamente ao biomarcador *VEGF* ao dia 21;
- **H6.1** (alternativa) – Existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de estudo relativamente ao biomarcador *VEGF* ao dia 21.

Tabela 3 – Hipóteses possíveis do estudo

Dia	Dia 7		Dia 14		Dia 21	
	Hipótese nula	Hipótese alternativa	Hipótese nula	Hipótese alternativa	Hipótese nula	Hipótese alternativa
<i>IL-8</i>	H1.0	H1.1	H2.0	H2.1	H3.0	H3.1
<i>VEGF</i>	H4.0	H4.1	H5.0	H5.1	H6.0	H6.1

2.6. Participantes

Os participantes desta investigação foram pacientes da clínica Dentária Egas Moniz, cujas motivações principais para a vinda à consulta foram o tratamento de recessões gengivais ou problemas estéticos e/ou de hipersensibilidade dentária.

Foram cumpridos todos os critérios de inclusão, e nenhum participante se enquadrou nos critérios de exclusão.

2.7. Critérios de inclusão

- Pacientes > 18 anos de idade;
- Presença de, pelo menos, uma recessão gengival;
- Recessão gengival classificada como RT1 de Cairo;
- Presença de, pelo menos, um milímetro de tecido queratinizado;
- Problema estético e/ou hipersensibilidade dentária.

2.8. Critérios de exclusão

- Presença de gengivite, periodontite não controlada e lesão endo-periodontal;
- Historial de cirurgia de enxerto de tecido na área a ser intervencionada;
- Fumadores de mais de 10 cigarros por dia;
- Gravidez;
- Perturbação psicológica (emocional e/ou depressiva);
- Irradiação (radioterapia/quimioterapia) dos maxilares nos últimos cinco anos;
- Antibioterapia sistémica nos últimos seis meses;
- Uso crónico de medicamentos anti-inflamatórios nos últimos seis meses;
- Toma de bifosfonatos;
- Lesão cervical cariiosa não tratada;
- Hábitos alcoólicos e/ou de drogas que causam problemas sistémicos;
- Índice de Placa/Índice Gengival > 15%;
- Junção amelo-cimento (JAC) não visível;
- Dentes decíduos.

2.9. Cronograma do estudo

O cronograma deste estudo encontra-se representado na Figura 2.

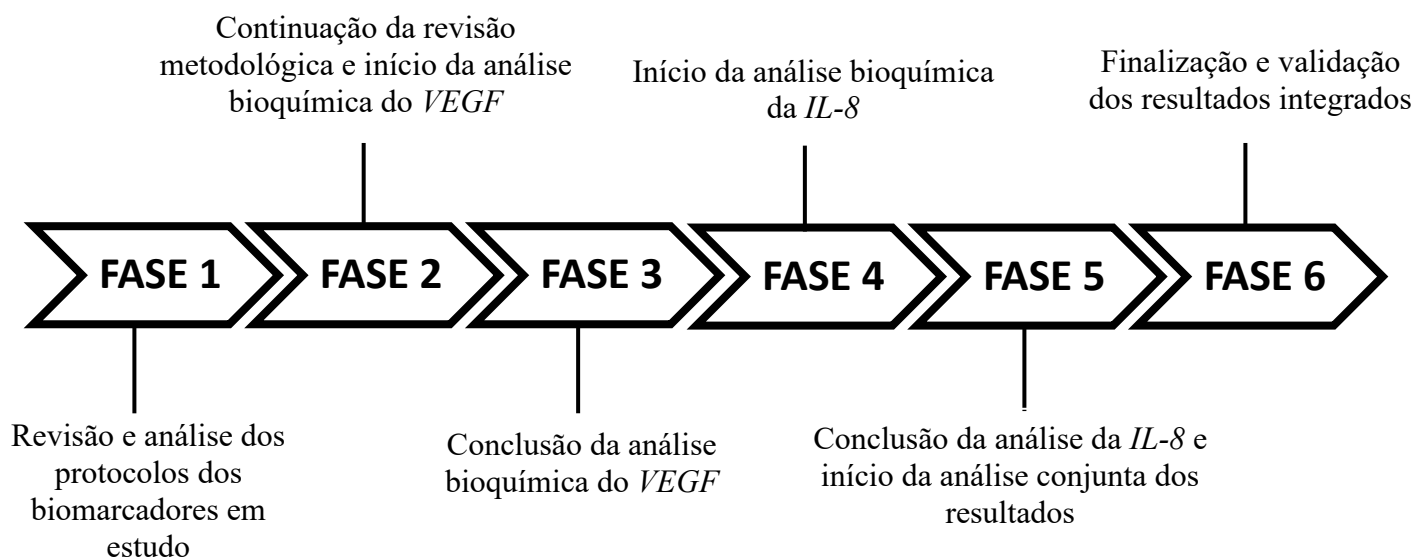


Figura 2 – Cronograma do estudo

2.10. Recolha de Fluido Crevicular Gengival e quantificação do volume

Para a análise bioquímica foram recolhidas amostras, em duplicado, do fluido crevicular gengival (FCG), no decorrer dos trabalhos anteriores, através de uma técnica não invasiva e relativamente simples, usando *Periopapers*®.

Após a recolha, o volume foi quantificado no *Periotron*® 8010 (Figura 3), previamente calibrado com soro bovino.



Figura 3 – *Periotron*®, modelo 8010 (Clínica Dentária Egas Moniz).

As amostras foram depois colocadas em tubos de ensaio (*Eppendorf*®) e identificadas com um código específico de cada paciente. Em laboratório, estas amostras foram conservadas a -80°C, até à realização da análise bioquímica.

2.11. Análises laboratoriais

2.11.1. Protocolo de preparação das amostras

Inicialmente procedeu-se à diluição do FCG recolhido. Para isso, foram adicionados 100 microlitros de *PBS* (solução salina tamponada com fosfato), a cada *Periopaper*®, em cada tubo *Eppendorf*®. Após incubação de 5 minutos em gelo a 4°C, os *Eppendorfs*® foram centrifugados a 10 000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Ainda antes da centrifugação, foi necessário travar a ponta laranja de cada *Periopaper*® na tampa de cada *Eppendorf*® (Figura 4), assegurando após a centrifugação a completa recuperação do conteúdo presente no *Periopaper*®.



Figura 4 – *Periopaper*® a ser fixado na parte superior de um *Eppendorf*®

Finalizada a centrifugação, os *Periopapers*® foram descartados e o eluente foi novamente armazenado a -80°C até análise, através da técnica *ELISA*.

2.11.2. Protocolo de análise das amostras

Foram realizados testes *ELISA* para avaliação de 2 biomarcadores: *VEGF* e *IL-8*. Para o *VEGF* as análises foram realizadas utilizando o *kit Human VEGF SimpleStep ELISA*® *Kit 96 Tests ab222510* (lote 1021098911) de acordo com as instruções do

fabricante (em anexo), adicionando 50 μ L da amostra ou padrão aos poços apropriados em duplicado (Figura 5).

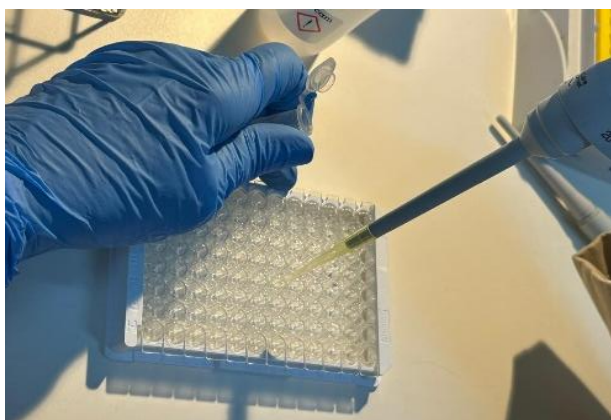


Figura 5 – Colocação da amostra nos poços apropriados

Para a *IL-8*, as análises foram realizadas utilizando o kit *Human IL-8 SimpleStep ELISA®Kit Fluorescent 96 Tests* ab229402 (lote 2101069029) de acordo com as instruções do fabricante (em anexo), adicionando 50 μ L da amostra ou padrão aos poços apropriados em duplicado.

As lavagens foram realizadas, de acordo com as instruções, num lavador de microplacas *Wellwash®* (*Thermo scientific*) (Figura 6).



Figura 6 – *Wellwash®* (*Thermo scientific*)

As incubações e leituras de foram realizadas num leitor de microplacas *Tecan Infinite M Plex 200 Pro* (Figuras 7A e 7B). Para o *VEGF* foi feita uma análise colorimétrica quantificada pela absorvância da cor a 450 nm e para a *IL-8* as leituras de fluorescência foram realizadas com excitação a 530 nm e emissão a 590 nm.

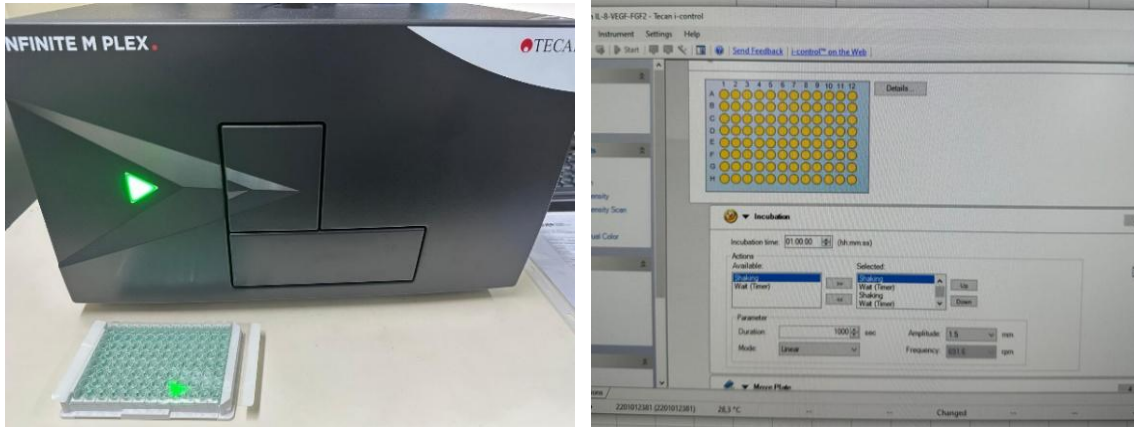


Figura 7A – Leitor de microplacas *Tecan Infinite M Plex 200 Pro*; **Figura 7B** – Configuração do software para incubação

Todos os dados foram depois exportados para uma folha de cálculo Excel (anexo) e calculadas as concentrações com referência a uma curva de calibração para a *IL-8* (Figura 8A) e outra curva de calibração para o *VEGF* (Figura 8B).

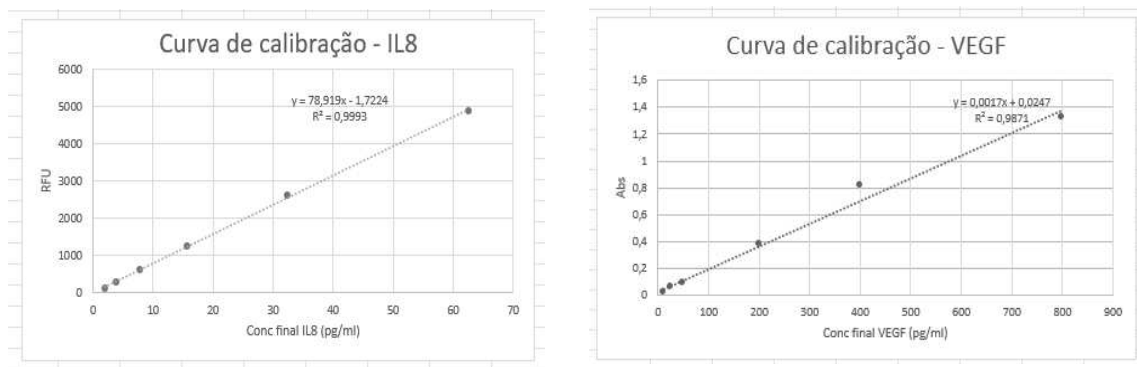


Figura 8A – Curva de calibração para a *IL-8*; **Figura 8B** – Curva de calibração para o *VEGF*

2.12. Análise estatística dos dados

O uso de testes paramétricos, que assumem normalidade e homogeneidade de variâncias foi inviabilizado, devido às distribuições não normais, confirmado por testes de normalidade (*Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk*) onde os dados apresentados não

são consistentes e detém elevada variabilidade. Desta forma, foram utilizados os testes não paramétricos. Através deles, foi possível fazer uma comparação intergrupos, através do teste U de *Mann-Whitney*, e intragrupos, através do teste de *Friedman*. Nesta análise fomos explorar diferentes momentos temporais, para verificar se existiam diferenças, entre os dois grupos de estudo (controlo e teste), pela correção de *Bonferroni*, para evitar falsos positivos. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$) e todas as análises foram realizadas com o programa *IBM SPSS Statistics v.30*.

Análise da variação de parâmetros bioquímicos no recobrimento radicular com proteínas derivadas da matriz de esmalte associado a enxerto de tecido conjuntivo

3. RESULTADOS

3.1. Quantificação dos valores de *IL-8*

Os resultados da análise bioquímica da *IL-8* foram organizados no formato média \pm desvio padrão na Tabela 4 e figura 9.

No dia da cirurgia, os níveis de *IL-8* são reduzidos e semelhantes nos dois grupos. Ao 7º dia, há um pico considerável na concentração de *IL-8* em ambos os grupos, com valores mais elevados no grupo teste. Nos dias 14 e 21, os níveis de *IL-8* voltam a reduzir em ambos os grupos, embora se mantenham mais elevados no grupo teste.

Tabela 4 – Valores médios da concentração de *IL-8* ($\mu\text{g/ml}$) ao longo do tempo

Tempo (t)	Grupo Controlo (CAF + CTG)*		Grupo Teste (CAF + CTG + EMD)*	
	MD (\pm DP)	MIN - MÁX	MD (\pm DP)	MIN - MÁX
Dia 0	22,34 \pm 16,8	1,10 - 67,05	25,33 \pm 16,0	4,09 - 61,68
Dia 7	86,97 \pm 51,9	2,30 - 163-91	137,99 \pm 157,6	2,86 - 546,59
Dia 14	18,41 \pm 16,3	0,97 - 50,10	78,00 \pm 101,8	3,00 - 361,15
Dia 21	26,42 \pm 30,4	1,07 - 93,64	42,20 \pm 57,1	3,18 - 202,05

(*) Os valores apresentados correspondem ao valor médio (MD) \pm desvio padrão (DP) limitado pelo valor mínimo e máximo observados para cada grupo em cada momento temporal para o biomarcador *IL-8*, contribuindo para uma noção da variabilidade dos valores.

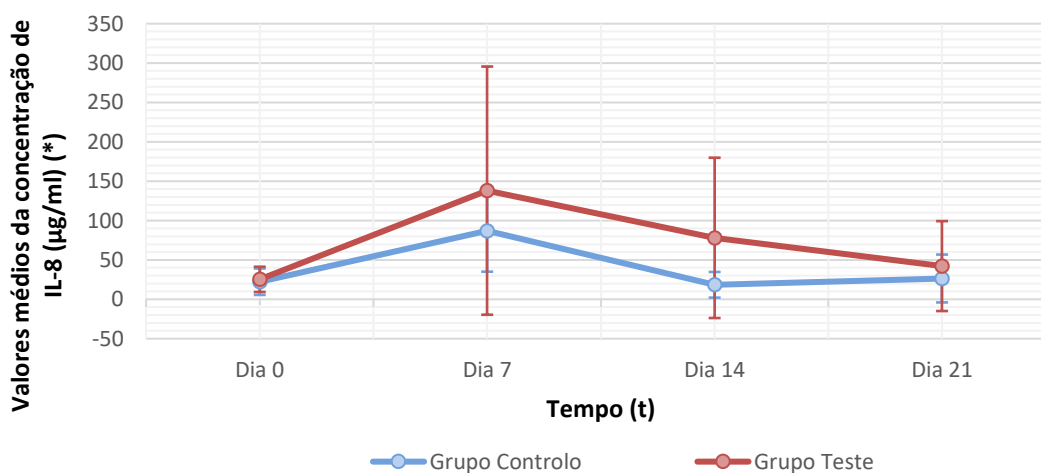


Figura 9 – Evolução temporal da concentração média de *IL-8* ($\mu\text{g/ml}$)

(*) Os valores apresentados correspondem ao valor médio da concentração de *IL-8* em cada momento temporal com as barras de erro que correspondem ao desvio padrão associado a cada valor.

Embora se observe uma variação em função do tempo, apenas se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o dia da cirurgia e o 7º dia para o grupo teste ($p = 0,023$) e entre os dias 7 e 14 para o grupo controle ($p = 0,021$), tal como se pode observar na tabela 5.

Tabela 5 – Valores de p em diferentes intervalos de tempo para a *IL-8* numa comparação intragrupo

Tempo (t)	Grupo Controle (CAF + CTG)	Grupo Teste (CAF + CTG + EMD)
	Valor-p	Valor-p
0 - 7	0,171	0,023*
0-14	1,000	1,000
0-21	1,000	1,000
7-14	0,021*	0,568
7-21	0,064	0,090
14-21	1,000	1,000

(*) valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

Quando comparamos os valores dos dois grupos, observamos que os valores do grupo teste mantiveram-se consistentemente mais elevados em relação ao grupo controle, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores de p em diferentes momentos temporais para a *IL-8* numa comparação intergrupo

Tempo (t)	Grupo Controle (CAF + CTG)	Grupo Teste (CAF + CTG + EMD)
	Valor-p	
Dia 0	0,569	
Dia 7	0,910	
Dia 14	0,055	
Dia 21	0,556	

(*) valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

3.2. Quantificação dos valores de *VEGF*

Os resultados da análise bioquímica do *VEGF*, foram organizados no formato média \pm desvio padrão na Tabela 7 e Figura 10.

No dia da cirurgia os níveis de *VEGF* foram semelhantes entre os dois grupos e ambos apresentaram um aumento ao 7º dia. Contudo, a partir do 14º, os perfis divergiram, pois o grupo controlo mostrou uma queda nos níveis de *VEGF* para o valor inicial, enquanto o grupo teste manteve níveis mais elevados. No dia 21 o grupo teste continuou a apresentar valores um pouco mais elevados, no entanto, as diferenças não foram estatisticamente significativas (Tabela 8).

Tabela 7 – Valores médios da concentração de *VEGF* ($\mu\text{g/ml}$) ao longo do tempo

Tempo (t)	Grupo Controlo (CAF + CTG)*		Grupo Teste (CAF + CTG + EMD)*	
	MD (\pm DP)	MIN - MÁX	MD (\pm DP)	MIN - MÁX
Dia 0	12,97 \pm 9,4	5,31 - 31,04	14,16 \pm 7,2	5,14 - 26,10
Dia 7	24,93 \pm 13,6	6,17 - 56,56	22,99 \pm 12,1	6,62 - 52,28
Dia 14	11,18 \pm 8,6	2,76 - 29,77	21,73 \pm 12,9	8,50 - 45,30
Dia 21	14,90 \pm 17,7	1,36 - 58,85	17,08 \pm 12,5	5,09 - 53,73

(*) Os valores apresentados correspondem ao valor médio (MD) \pm desvio padrão (DP) limitado pelo valor mínimo e máximo observados para cada grupo em cada momento temporal para o biomarcador *VEGF*, contribuindo para uma noção da variabilidade dos valores.

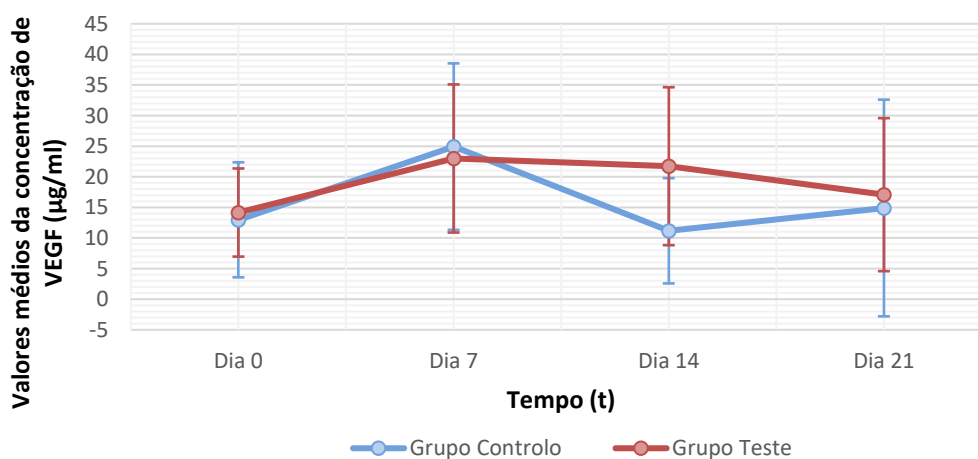


Figura 10 – Evolução temporal da concentração média de *VEGF* ($\mu\text{g/ml}$)

(*) Os valores apresentados correspondem ao valor médio da concentração de *VEGF* em cada momento temporal com as barras de erro que correspondem ao desvio padrão associado a cada valor.

Tabela 8 – Valores de p em diferentes intervalos de tempo para o *VEGF* numa comparação intragrupo

Tempo (t)	Grupo Controlo (CAF + CTG)	Grupo Teste (CAF + CTG + EMD)
	Valor-p	Valor-p
0-7	0,602	0,136
0-14	1,000	0,772
0-21	1,000	1,000
7-14	0,407	1,000
7-21	1,000	1,000
14-21	1,000	1,000

(*) valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

Quando comparamos os valores dos dois grupos, observamos que os valores do grupo teste foram mais elevados em relação ao grupo controlo, com exceção do 7º dia. Contudo, as diferenças apenas foram estatisticamente significativas no dia 14 ($p=0,015$), tal como se pode observar na tabela 9.

Tabela 9 – Valores de p em diferentes momentos temporais para o *VEGF* numa comparação intergrupo

Tempo (t)	Grupo Controlo (CAF + CTG)	Grupo Teste (CAF + CTG + EMD)
	Valor-p	
Dia 0	0,569	
Dia 7	0,569	
Dia 14	0,015*	
Dia 21	0,209	

(*) valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os benefícios a nível bioquímico da associação das proteínas derivadas da matriz do esmalte (*EMD*) com a cirurgia de retalho de avanço coronal (*CAF*) com autoenxerto de tecido conjuntivo (*CTG*). A ênfase foi colocada na análise da resposta inflamatória e da angiogénese na fase inicial da cicatrização, mediante a quantificação dos biomarcadores *IL-8* e *VEGF*, considerados relevantes ao nível dos processos inflamatórios e angiogénicos. A escolha destes dois biomarcadores (*IL-8* e *VEGF*), pretendia permitir a análise dos efeitos do *EMD* sobre os dois extremos da janela inflamatório-regenerativa da cicatrização periodontal. Procurou-se propor um modelo de avaliação molecular centrado na modulação da inflamação e promoção da angiogénese, dois pilares essenciais da regeneração periodontal bem-sucedida e usados no estudo de Dias et al. (2022), um estudo com moldes muito semelhantes à presente investigação. Seleccionámos apenas estes biomarcadores pois todos os outros analisados nesse estudo (*IL-1 β* e *TNF- α* , *IL-6*, *MIP-1 α/β* , *PDGF*), foram de difícil interpretação ou então não se demonstraram significativos em nenhum momento analisado (Dias et al., 2022).

Na presente investigação verificou-se um aumento na concentração de *IL-8* para ambos os grupos controlo e teste aos 7 dias de observação, indicativo da antecipável resposta inflamatória após cirurgia, no entanto, não foi significativo. Posteriormente, os níveis retornaram aos valores basais em ambos os grupos, com a resolução da inflamação, até ao dia 21, mas essa diminuição não se verificou significativa em nenhum momento. Apesar dos resultados apresentados por Dias et al. (2020), em que os níveis de *IL-8* foram elevados em ambos os grupos após 7 dias de observação, no entanto apenas com significância estatística para o grupo controlo, no presente estudo nenhum dos grupos apresentou resultados com significância estatística.

A *IL-8* distingue-se de outras citocinas inflamatórias pela sua capacidade de ser sintetizada logo nas fases iniciais da resposta inflamatória e de permanecer ativa por longos períodos, que podem estender-se por dias, mas tendo um papel menor na fase de remodelação. Esta característica contrasta com a maioria das citocinas pró-inflamatórias (*TNF- α* , a *IL-1 β* e a *IL-6*), cuja produção e libertação tendem a ocorrer rapidamente e tende a desaparecer em poucas horas após o início da inflamação (Remick, 2005). Nesse

sentido, a escolha no nosso estudo da *IL-8* permitiu comparar a inflamação 7 dias após a cirurgia periodontal.

Stähli e seus colaboradores (2020) realizaram um estudo onde se avaliou os potenciais efeitos no *EMD* na cicatrização precoce e nos resultados clínicos após o tratamento de recessões gengivais. O tratamento das recessões envolveu a técnica de túnel de avanço coronal modificado (*MCAT*) + *CTG* com ou sem *EMD*. Foram recolhidas amostras de FCG em 2, 7, 14 dias e após 6 meses da intervenção cirúrgica. Em ambos os grupos os níveis de *IL-8* aumentaram de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao fim de 2 dias de observação em relação aos valores basais. Estes valores diminuíram posteriormente ao fim de 7 dias ($p < 0,05$), no entanto sempre mais elevados do que os valores basais (Stähli et al., 2020). Resultado semelhante foi obtido no estudo de Villa et al., (2016) no qual os autores constataram que com a aplicação de *EMD* à cirurgia *CAF* com *CTG*, os níveis de *IL-8* apresentaram um pico mais alto ao 7º dia, e ao 14º dia esses níveis baixaram, sendo esta tendência repetida no grupo em que não se aplicou *EMD*. Todos estes resultados da *IL-8* sugerem que o padrão temporal da expressão de *IL-8* pode ser mais influenciado pelo próprio processo de cicatrização do que pela presença ou não de *EMD*. Segundo os mesmos autores, a falta de evidência para o efeito positivo do *EMD* poderá resultar do pequeno tamanho dos grupos e da grande variabilidade interindividual, o que também representa a limitação que encontramos na nossa investigação (Villa et al., 2016).

Num estudo realizado *in vitro* por Myhre e seus colaboradores (Myhre et al., 2006), em sangue humano, demonstraram que o *EMD* quando adicionado ao sangue previamente estimulado com componentes da parede celular bacteriana (como por exemplo polissacarídeo e peptidoglicanos), foi capaz de reduzir significativamente a libertação de citocinas pró-inflamatórias. Especificamente, a produção de *IL-8*, que é uma quimiocina envolvida no recrutamento de neutrófilos, foi significativamente atenuada, sugerindo que possui um potencial anti-inflamatório (Myhre et al., 2006).

O biomarcador *VEGF* também apresentou um perfil similar em ambos os grupos no dia da cirurgia com um aumento ao 7º dia como seria esperado como parte da resposta inflamatória aguda e do estímulo inicial à angiogénese. Ao 14º dia, estes perfis divergiram, com uma redução significativa no grupo controlo ($p = 0,015$), sugerindo uma resolução da fase inflamatória, mas com o grupo teste a manter os seus níveis elevados,

indicando uma estimulação angiogénica mais prolongada, possivelmente por influência do *EMD*. Este efeito corrobora o observado por Dias e a sua equipa de investigadores (Dias et al., 2022), em que os níveis de *VEGF* no grupo teste mantiveram-se elevados, reforçando a ideia de uma resposta regenerativa mais sustentada. O uso de *EMD* em cirurgias de recobrimento radicular parece promover um aumento da expressão de *VEGF*, sugerindo que o *EMD* pode contribuir para o processo angiogénico e de cicatrização (Dias et al., 2022).

O *VEGF* aumenta a permeabilidade vascular, facilitando a migração de células do sistema imunitário e regula diretamente a formação de novos vasos sanguíneos, sendo crucial na cicatrização e na resposta à hipoxia, o que o torna altamente responsivo a alterações no microambiente oral. Por sua vez, o *VEGF* irá contribuir mais tarde para a maturação e estabilidade dos recém-formados vasos sanguíneos (Ferrara, 2004).

Em 2018, Ghallab et al. numa revisão da literatura sobre as evidências disponíveis sobre o uso de biomarcadores presentes no fluido crevicular gengival (FCG) e na saliva para o diagnóstico periodontal, concluíram que a utilização combinada de múltiplos biomarcadores permitiu uma avaliação mais precisa e específica do estado periodontal dos pacientes (Ghallab et al., 2018). Paralelamente em 2023, Blanco-Pintos et al. publicaram uma revisão sistemática com meta-análise, em que o objetivo foi avaliar a precisão diagnóstica de diferentes combinações de biomarcadores no FCG, para a deteção da periodontite em indivíduos sistematicamente saudáveis (Blanco-Pintos et al. em 2023). Foram avaliadas diferentes combinações de biomarcadores (*IL-6* com *MMP-8*, *IL-6* com *IL-1 β* , *IL-1 β* com *MMP-8* e ainda a combinação de três com *IL-6*, *IL-1 β* e *MMP-8*). Os resultados demonstraram que a combinação de apenas dois biomarcadores se revelou promissora, alcançando níveis elevados de precisão diagnóstica. Os autores sugeriram assim, que a associação entre uma citocina pró-inflamatória e uma citocina anti-inflamatória poderá constituir uma estratégia eficaz para o diagnóstico clínico e molecular da periodontite e foi precisamente isto que procurámos comprovar na presente investigação.

Miron et al. (2015) num estudo de revisão concluiu que a combinação destes dois marcadores (*IL-8* e *VEGF*) evidenciou que o *EMD* não reduz apenas a inflamação local, mas também estimula a regeneração tecidual por mecanismos angiogénicos (Miron et al., 2015).

Os dados obtidos da presente investigação, permitem afirmar com evidência estatística que os valores de *VEGF* foram superiores ao 14º dia para o grupo teste em relação ao grupo controle, reforçando as conclusões de Parkar et al., (2004), em que demonstraram que o *EMD* regula positivamente os fatores de crescimento. A inconsistência entre diferentes estudos quanto ao efeito anti-inflamatório do *EMD* sugere que esta capacidade pode depender de múltiplos fatores, tais como o tipo de tecido, a técnica cirúrgica, o tempo de aplicação e a resposta individual do paciente. A avaliação conjunta da *IL-8* e *VEGF* permite assim, uma abordagem temporal e funcionalmente integrada da resposta cicatricial. Enquanto a *IL-8* informa sobre a intensidade da resposta inflamatória inicial, cujos valores altos, podem comprometer a qualidade da regeneração, o *VEGF* reflete o grau de estímulo angiogénico e potencial reparador, promovido pelo tratamento (Parkar et al., 2004).

Os biomarcadores têm desta forma, um papel essencial na criação e análise de novas abordagens terapêuticas, favorecendo a identificação de tratamentos mais direcionados e eficientes. A sua influência na prática clínica é notável, marcando uma mudança significativa na forma como se compreende e trata a doença periodontal (Nunes et al., 2024). O conhecimento da variação da concentração destes biomarcadores, irá contribuir para a delimitação de protocolos de tratamento individualizados, com enfoque na obtenção dos melhores resultados. Contudo, o custo/benefício da análise destes biomarcadores deve ser minuciosamente estimado, para impedir uma sobrecarga em termos de custo para o paciente.

5. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O presente trabalho posiciona-se como um estudo piloto relevante, permitindo estimar a variabilidade dos biomarcadores e fornecer dados necessários para o cálculo de uma amostra adequada em investigações futuras de maior escala.

Um dos aspectos relevantes a considerar foi a necessidade de excluir determinadas amostras durante a análise, devido à presença de resultados extremos. Estes valores, identificados como “*outliers*”, comprometiam a validade dos pressupostos exigidos para a aplicação dos testes estatísticos utilizados. A sua exclusão parte de uma decisão metodológica fundamentada, de modo a assegurar a fiabilidade da análise dos dados remanescentes. As necessárias diluições do FCG, coletado em volumes muito reduzidos, podem ter introduzido vieses na análise bioquímica das amostras, como a contaminação com sangue ou saliva, saturação excessiva do *Periopaper*® ou erros técnicos na manipulação laboratorial

Apesar destas limitações, os dados obtidos permitiram identificar tendências bioquímicas relevantes, mesmo que não generalizáveis de forma definitiva, fornecem uma base sólida para formulação de hipóteses e planeamento de estudos futuros mais amplos e controlados.

Análise da variação de parâmetros bioquímicos no recobrimento radicular com proteínas derivadas da matriz de esmalte associado a enxerto de tecido conjuntivo

6. CONCLUSÃO

Este estudo clínico, randomizado e controlado, permitiu retirar as seguintes conclusões:

- Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de estudo relativamente aos biomarcadores *IL-8* e *VEGF* aos dias 7 e 21.
- Apenas foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de estudo para o biomarcador *VEGF* ao dia 14 ($p=0,015$), com o grupo teste a obter valores significativamente mais elevados.

Em resumo da análise biomolecular, a utilização do *EMD* em cirurgia de recobrimento radicular promoveu um significativo aumento da expressão do *VEGF*, sugerindo que o *EMD* pode contribuir para uma melhoria do processo de cicatrização e angiogénese.

No entanto, são necessários mais estudos com uma maior amostra para sustentar e comprovar os resultados obtidos na presente investigação e obter conclusões definitivas e mais robustas.

Análise da variação de parâmetros bioquímicos no recobrimento radicular com proteínas derivadas da matriz de esmalte associado a enxerto de tecido conjuntivo

7. PERSPETIVAS FUTURAS

Existe um número muito baixo de investigações que utilizam marcadores moleculares quando avaliam o impacto do *EMD* associado à técnica cirúrgica de retalho de avanço coronal com enxerto de tecido conjuntivo (*CAF* + *CTG*) no tratamento de recessões gengivais. A maioria dos estudos disponíveis concentra-se em características clínicas, deixando de lado uma compreensão mais profunda dos processos moleculares envolvidos, como a modulação da resposta inflamatória, diferenciação celular, síntese da matriz extracelular e remodelação óssea, pelo que se torna imperativo que futuras investigações abordem esta temática. A compreensão dos efeitos imunobiológicos do *EMD* poderá abrir portas para a sua aplicação mais direcionada, permitindo o desenvolvimento de terapias mais personalizadas, baseadas no perfil biológico do paciente. A continuidade e o aprofundamento desta linha de pesquisa, são essenciais não apenas para validar a eficácia do *EMD* a nível molecular, mas também para elucidar sobre os seus mecanismos de ação, contribuindo significativamente para o avanço da periodontologia regenerativa baseada na evidência científica.

Embora o uso de biomarcadores acarrete custos adicionais e desafios logísticos, o seu potencial para transformar a compreensão dos mecanismos regenerativos e orientar a prática clínica de forma personalizada torna-os um investimento estratégico e necessário.

Análise da variação de parâmetros bioquímicos no recobrimento radicular com proteínas derivadas da matriz de esmalte associado a enxerto de tecido conjuntivo

8. BIBLIOGRAFIA

Afacan, B., Öztürk, V. Ö., Paşalı, Ç., Bozkurt, E., Köse, T., & Emingil, G. (2019). *Gingival crevicular fluid and salivary HIF-1 α , VEGF, and TNF- α levels in periodontal health and disease. Journal of Periodontology, 90(7), 788–797. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0412>*

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>*

Al-Hezaimi, K., Al-Fahad, H., O'Neill, R., Shuman, L., & Griffin, T. (2012). The effect of enamel matrix protein on gingival tissue thickness in vivo. *Odontology, 100(1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/s10266-011-0022-5>*

Attar, N. B., Banodkar, A. B., Gaikwad, R. P., Patil, C. L., & Simon, S. (2018). *Evaluation of gingival crevicular fluid volume in relation to clinical periodontal status with periotron 8000. International Journal of Applied Dental Sciences, 4(1):68-71.*

Aydinyurt, H. S., Tekin, Y., & Ertugrul, A. S. (2019). *The effect of enamel matrix derivatives on root coverage: A 12-month follow-up of a randomized clinical trial. Brazilian Oral Research, 33, e006. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0006>*

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>*

Barrozo, Y. D. L., Da Silveira, V. R. S., Martins, R. S., Carvalho, R. S., & Moreira, M. M. S. M. (2016). *Coronally advanced flap surgery with enamel matrix derivative in the treatment of gingival recession: A systematic review. Revista Odonto Ciência, 31(1), 25. <https://doi.org/10.15448/1980-6523.2016.1.15413>*

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., Lambert, F., McCauley, L., Quirynen, M., Renvert, S., ... 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(S20). <https://doi.org/10.1111/jcpe.12957>

Berlucchi, I., Francetti, L., Del Fabbro, M., Testori, T., & Weinstein, R. L. (2002). *Enamel matrix proteins (Emdogain) in combination with coronally advanced flap or subepithelial connective tissue graft in the treatment of shallow gingival recessions*. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*, 22(6), 583–593.

Bibi, 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*, 26(5), 1208. <https://doi.org/10.3390/molecules26051208>

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., & Sculean, A. (2009). *Does periodontal tissue regeneration really work?* *Periodontology 2000*, 51, 208-219. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00317.x>

Brill, N., & Krasse, B. O. (1958). *The Passage of Tissue Fluid into the Clinically Healthy Gingival Pocket*. *Acta Odontologica Scandinavica*, 16(3), 233–245. <https://doi.org/10.3109/00016355809064110>

Buduneli, N., Bıyikoğlu, B., & Kinane, D. F. (2024). *Utility of gingival crevicular fluid components for periodontal diagnosis*. *Periodontology 2000*, 95(1), 156–175. <https://doi.org/10.1111/prd.12595>

Bumm, C. V., Schwendicke, F., Heck, K., Frasher, I., Summer, B., Ern, C., Heym, R., Werner, N., & Folwaczny, M. (2024). *The Role of Interleukin-8 in the Estimation of Responsiveness to Steps 1 and 2 of Periodontal Therapy*. *Journal of Clinical Periodontology*, 51(11), 1433–1442. <https://doi.org/10.1111/jcpe.14055>

Burkhardt, R., Hammerle, C. H., Lang, N. P. & Research Group on Oral Soft Tissue Biology & Wound Healing (2015). *Self-reported pain perception of patients after mucosal graft harvesting in the palatal area*. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(3), 281–287. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12357>

Cadenas De Llano-Pérula, M., Castro, A. B., Danneels, M., Schelfhout, A., Teughels, W., & Willems, G. (2023). Risk factors for gingival recessions after orthodontic treatment: A systematic review. *European Journal of Orthodontics*, 45(5), 528–544. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjad026>

Cafiero, C., Spagnuolo, G., Marenzi, G., Martuscelli, R., Colamaio, M., & Leuci, S. (2021). *Predictive Periodontitis: The Most Promising Salivary Biomarkers for Early Diagnosis of Periodontitis*. *Journal of Clinical Medicine*, 10(7), 1488. <https://doi.org/10.3390/jcm10071488>

Cairo, F., Pagliaro, U., & Nieri, M. (2008). *Treatment of gingival recession with coronally advanced flap procedures: A systematic review*. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(s8), 136–162. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01267.x>

Casillas, A. P. V., Espinosa, B. I. M., & Yáñez, S. A. B. (2015). *Comparación clínica del uso del colgajo de avance coronal e injerto de tejido conectivo subepitelial con o sin proteínas derivadas de la matriz del esmalte para la cobertura de recesiones gingivales. Caso clínico*. *Revista Odontológica Mexicana*, 19(4), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.rodex.2015.10.009>

Chambrone, L., & Tatakis, D. N. (2015). *Periodontal Soft Tissue Root Coverage Procedures: A Systematic Review From the AAP Regeneration Workshop*. *Journal of Periodontology*, 86(2-s), S8–S51. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.130674>

Chambrone, L., Ortega, M. A. S., Sukekava, F., Rotundo, R., Kalemaj, Z., Buti, J., & Prato, G. P. P. (2019). *Root coverage procedures for treating single and multiple recession-type defects: An updated Cochrane systematic review. Journal of Periodontology*, 90(12), 1399–1422. <https://doi.org/10.1002/JPER.19-0079>

Chrysanthakopoulos N. A. (2011). Aetiology and severity of gingival recession in an adult population sample in Greece. *Dental research journal*, 8(2), 64–70.

Cortellini, P., & Bissada, N. F. (2018). *Mucogingival conditions in the natural dentition: Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations. Journal of Periodontology*, 89(S1). <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0671>

Cortellini, P., & Pini Prato, G. (2012). *Coronally advanced flap and combination therapy for root coverage. Clinical strategies based on scientific evidence and clinical experience. Periodontology 2000*, 59(1), 158–184. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00434.x>

Dai, A., Huang, J., Ding, P., & Chen, L. (2019). Long-term stability of root coverage procedures for single gingival recessions: *A systematic review and meta-analysis. Journal of Clinical Periodontology*, 46(5), 572–585. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13106>

Delucchi, F., Canepa, C., Canullo, L., Pesce, P., Isola, G., & Menini, M. (2023). *Biomarkers from Peri-Implant Crevice 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>

Dias, A. T., De Menezes, C. C., Kahn, S., Fischer, R. G., Da Silva Figueredo, C. M., & Fernandes, G. V. D. O. (2022). *Gingival recession treatment with enamel matrix derivative associated with coronally advanced flap and subepithelial connective tissue graft: A split-mouth randomized controlled clinical trial with molecular evaluation. Clinical Oral Investigations*, 26(2), 1453–1463. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04119-9>

Difloe-Geisert, J. C., Müller, J. S., Weiger, R., & Walter, C. (2024). Impact of oral piercings on periodontal health - A systematic review. *International journal of dental hygiene*, 22(1), 24–34. <https://doi.org/10.1111/idh.12734>

Discepoli, N., Mirra, R., & Ferrari, M. (2019). *Efficacy of Enamel Derivatives to Improve Keratinized Tissue as Adjunct to Coverage of Gingival Recessions: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Materials*, 12(17), 2790. <https://doi.org/10.3390/ma12172790>

Fernández-Reyes, M., Márquez-Arrico, Cf., Silvestre, Fj., Perea-Galera, L., Silvestre-Rangil, J., & Rocha, M. (2020). *Comparison of three fluids for calibration of the new Periotron® 8010*. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 0–0. <https://doi.org/10.4317/medoral.25917>

Ferrara, N. (2004). *Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress*. *Endocrine Reviews*, 25(4), 581–611. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0027>

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>

Gennai, S., Guiza, Z. B., Orsolini, C., & Gosset, M. (2022). *The influence of non-carious lesions in the surgical treatment of gingival recession: A systematic review & meta-analysis*. *Journal of Dentistry*, 117, 103922. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2021.103922>

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>

Gomes, S. C., Piccinin, F. B., Oppermann, R. V., Susin, C., & Marcantonio, R. A. (2009). *The effect of smoking on gingival crevicular fluid volume during the treatment of gingivitis*. *Acta odontologica latinoamericana : AOL*, 22(3), 201–206.

González-Febles, J., Romandini, M., Laciár-Oudshoorn, F., Noguerol, F., Marruganti, C., Bujaldón-Daza, A., Zabalegui, I., & Sanz, M. (2023). *Tunnel vs. coronally advanced flap in combination with a connective tissue graft for the treatment of multiple gingival recessions: A multi-center randomized clinical trial*. *Clinical Oral Investigations*, 27(7), 3627–3638. <https://doi.org/10.1007/s00784-023-04975-7>

Günday, S., Topcu, A. O., Ercan, E., & Yamalik, N. (2014). *Analysis of Daytime Variations in Gingival Crevicular Fluid: A Circadian Periodicity?* *Journal of Periodontology*, 85(3). <https://doi.org/10.1902/jop.2013.130367>

Gupta, S., Chhina, S., & Arora, S. A. (2018). *A systematic review of biomarkers of gingival crevicular fluid : Their predictive role in diagnosis of periodontal disease status.* *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 8(2), 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2018.02.002>

Hajishengallis, G., & Korostoff, J. M. (2017). *Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later.* *Periodontology 2000*, 75(1), 116–151. <https://doi.org/10.1111/prd.12181>

Hammarström L. (1997). *Enamel matrix, cementum development and regeneration.* *Journal of clinical periodontology*, 24(9 Pt 2), 658–668. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1997.tb00247.x>

Hayrapetyan, H., Tran, T., Tellez-Corrales, E., & Madiraju, C. (2023). *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications.* *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2612, 1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2903-1_1

Heng, N. H. M., Zahlten, J., Cordes, V., Ong, M. M., Goh, B. T., N'Guessan, P. D., & Pischon, N. (2015). *Effects of Enamel Matrix Derivative and Transforming Growth Factor- β 1 on Connective Tissue Growth Factor in Human Periodontal Ligament Fibroblasts.* *Journal of Periodontology*, 86(4), 569–577. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.120448>

Hong, I., Pae, H.-C., Song, Y. W., Cha, J.-K., Lee, J.-S., Paik, J.-W., & Choi, S.-H. (2020). *Oral Fluid Biomarkers for Diagnosing Gingivitis in Human: A Cross-Sectional Study.* *Journal of Clinical Medicine*, 9(6), 1720. <https://doi.org/10.3390/jcm9061720>

Ito, H., Numabe, Y., Hashimoto, S., Uehara, S., Wu, Y. H., & Ogawa, T. (2021). *Usefulness of hemoglobin examination in gingival crevicular fluid during supportive periodontal therapy to diagnose the pre-symptomatic state in periodontal disease.* *Clinical oral investigations*, 25(2), 487–495. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03396-0>

Jepsen, S., Caton, J. G., Albandar, J. M., Bissada, N. F., Bouchard, P., Cortellini, P., Demirel, K., De Sanctis, M., Ercoli, C., Fan, J., Geurs, N. C., Hughes, F. J., Jin, L., Kantarci, A., Lalla, E., Madianos, P. N., Matthews, D., McGuire, M. K., Mills, M. P., ... Yamazaki, K. (2018). *Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*. *Journal of Periodontology*, 89(S1). <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0733>

Kriauciunas, A., Zekonis, G., Gedvilaite, G., Duseikaitė, M., Pileckaitė, E., Pacauskiene, I., & Liutkeviciene, R. (2024). *Vascular Endothelial Growth Factor A serum levels and common gene polymorphisms in generalized periodontitis affected patients*. *Acta odontológica Scandinavica*, 82(1), 74–81. <https://doi.org/10.1080/00016357.2023.2260000>

Kulakauskienė, R., Aukštakalnis, R., & Šadzevičienė, R. (2020). *Enamel matrix derivate induces periodontal regeneration by activating growth factors: A review*. *Stomatologija*, 22(2), 49–53.

Leppilahti, J. M., Hernández-Ríos, P. A., Gamonal, J. A., Tervahartiala, T., Brignardello-Petersen, R., Mantyla, P., Sorsa, T., & Hernández, M. (2014). *Matrix metalloproteinases and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid provide site-specific diagnostic value for chronic periodontitis*. *Journal of clinical periodontology*, 41(4), 348–356. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12223>

Lyngstadaas, S., Wohlfahrt, J., Brookes, S., Paine, M., Snead, M., & Reseland, J. (2009). *Enamel matrix proteins; old molecules for new applications*. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 12(3), 243–253. <https://doi.org/10.1111/j.1601-6343.2009.01459.x>

Marschner, F., Lechte, C., Kanzow, P., Hraský, V., & Pfister, W. (2025). *Systematic review and meta-analysis on prevalence and risk factors for gingival recession*. *Journal of Dentistry*, 155, 105645. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2025.105645>

Matsushima, K., Yang, D., & Oppenheim, J. J. (2022). *Interleukin-8: An evolving chemokine*. *Cytokine*, 153, 155828. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155828>

Maymon-Gil, T., Weinberg, E., Nemcovsky, C., & Weinreb, M. (2016). *Enamel Matrix Derivative Promotes Healing of a Surgical Wound in the Rat Oral Mucosa*. *Journal of Periodontology*, 87(5), 601–609. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.150567>

McGuire, M. K., & Cochran, D. L. (2003). Evaluation of Human Recession Defects Treated with Coronally Advanced Flaps and Either Enamel Matrix Derivative or Connective Tissue. Part 2: Histological Evaluation. *Journal of Periodontology*, 74(8), 1126–1135. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.8.1126>

McGuire, M. K., & Nunn, M. (2003). *Evaluation of Human Recession Defects Treated with Coronally Advanced Flaps and Either Enamel Matrix Derivative or Connective Tissue. Part 1: Comparison of Clinical Parameters*. *Journal of Periodontology*, 74(8), 1110–1125. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.8.1110>

Mercado, F., Hamlet, S., & Ivanovski, S. (2020). *A 3-year prospective clinical and patient-centered trial on subepithelial connective tissue graft with or without enamel matrix derivative in Class I-II Miller recessions*. *Journal of Periodontal Research*, 55(2), 296–306. <https://doi.org/10.1111/jre.12715>

Meza Mauricio J, Furquim CP, Bustillos-Torrez W, Soto Penaloza D, Penarrocha-Oltra D, Retamal-Valdes B, Faveri M (2021). *Does enamel matrix derivative application provide additional clinical benefits in the treatment of maxillary Miller class I and II gingival recession? A systematic review and meta-analysis*. *Clin Oral Investig* 25:1613–1626. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-03782-2>

Miron, R. J., Dard, M., & Weinreb, M. (2015). *Enamel matrix derivative, inflammation and soft tissue wound healing*. *Journal of Periodontal Research*, 50(5), 555–569. <https://doi.org/10.1111/jre.12245>

Miron, R. J., Sculean, A., Cochran, D. L., Froum, S., Zucchelli, G., Nemcovsky, C., Donos, N., Lyngstadaas, S. P., Deschner, J., Dard, M., Stavropoulos, A., Zhang, Y., Trombelli, L., Kasaj, A., Shirakata, Y., Cortellini, P., Tonetti, M., Rasperini, G., Jepsen, S., & Bosshardt, D. D. (2016). *Twenty years of enamel matrix derivative: The past, the present and the future*. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(8), 668–683. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12546>

Mohamed, H. G., Idris, S. B., Ahmed, M. F., Åström, A. N., Mustafa, K., Ibrahim, S. O., & Mustafa, M. (2015). *Influence of type 2 diabetes on local production of inflammatory molecules in adults with and without chronic periodontitis: A cross-sectional study*. *BMC Oral Health*, 15(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12903-015-0073-z>

Mohammed-Salih, H. S., & Saloom, H. F. (2022). *Collection, Storage and Protein Extraction Method of Gingival Crevicular Fluid for Proteomic Analysis*. *Baghdad Science Journal*, 19(2), 0368. <https://doi.org/10.21123/bsj.2022.19.2.0368>

Mostafa, D., & Fatima, N. (2022). “*Gingival Recession And Root Coverage Up To Date, A literature Review*”. *Dentistry Review*, 2(1), 100008. <https://doi.org/10.1016/j.dentre.2021.100008>

Myhre, A. E., Lyngstadaas, S. P., Dahle, M. K., Stuestøl, J. F., Foster, S. J., Thiemermann, C., Lilleaasen, P., Wang, J. E., & Aasen, A. O. (2006). *Anti-inflammatory properties of enamel matrix derivative in human blood*. *Journal of Periodontal Research*, 41(3), 208–213. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2005.00863.x>

Mythri, S., Arunkumar, S., Hegde, S., Rajesh, S., Munaz, M., & Ashwin, D. (2015). *Etiology and occurrence of gingival recession—An epidemiological study*. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 19(6), 671. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.156881>

Nardi, G. M., Ferrara, E., Converti, I., Cesarano, F., Scacco, S., Grassi, R., Gnoni, A., Grassi, F. R., & Rapone, B. (2020). *Does Diabetes Induce the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Periodontal Tissues? A Systematic Review*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(8), 2765. <https://doi.org/10.3390/ijerph17082765>

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, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2016/1804727>

Niklander, S., Bordagaray, M. J., Fernández, A., & Hernández, M. (2021). *Vascular Endothelial Growth Factor: A Translational View in Oral Non-Communicable Diseases*. *Biomolecules*, 11(1), 85. <https://doi.org/10.3390/biom11010085>

Nunes, P. R., Carvalho, J. V. T. D., França, A. E., Mendonça, L. T. D., Almeida, A. I. D. S. D., Pereira, D. M. T., Sousa, P. F. G. D., Seabra, B. C., Souza, V. C. D., & Gonçalves, A. C. (2024). Revisão de casos clínicos com biomarcadores. *Research, Society and Development*, 13(9), e1813946669. <https://doi.org/10.33448/rsd-v13i9.46669>

Palioto, D. B., Coletta, R. D., Graner, E., Joly, J. C., & De Lima, A. F. M. (2004). *The Influence of Enamel Matrix Derivative Associated With Insulin-Like Growth Factor-I on Periodontal Ligament Fibroblasts*. *Journal of Periodontology*, 75(4), 498–504. <https://doi.org/10.1902/jop.2004.75.4.498>

Pasarin, L., Martu, M.-A., Ciurcanu, O. E., Luca, E. O., Salceanu, M., Anton, D., Martu, C., Martu, S., & Esanu, I. M. (2023). *Influence of Diabetes Mellitus and Smoking on Pro- and Anti-Inflammatory Cytokine Profiles in Gingival Crevicular Fluid*. *Diagnostics*, 13(19), 3051. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13193051>

Pashley, David H. (1976). *A mechanistic analysis of gingival fluid production*. *Journal of Periodontal Research*, 11(2), 121–134. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1976.tb00060.x>

Pranali, G. (2020). *A COMPREHENSIVE UPDATED REVIEW ON GINGIVAL CREVICULAR FLUID: CHARACTERISTICS, COLLECTION AND ESTIMATION*. *Journal of Medical Pharmaceutical And Allied Sciences*, 9(1), 2405–2411. <https://doi.org/10.22270/jmpas.v9i1.901>

Preianò, M., Savino, R., Villella, C., Pelaia, C., & Terracciano, R. (2020). *Gingival Crevicular Fluid Peptidome Profiling in Healthy and in Periodontal Diseases*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5270. <https://doi.org/10.3390/ijms21155270>

Rajapakse, P. S., McCracken, G. I., Gwynnett, E., Steen, N. D., Guentsch, A., & Heasman, P. A. (2007). *Does tooth brushing influence the development and progression of non-inflammatory gingival recession? A systematic review*. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(12), 1046–1061. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01149.x>

Reddy, S. S. P., & Manohar, B. (2024). *Histological and whole-genome sequencing analysis of coronally advanced flap with connective tissue graft for the treatment of gingival recession—A case study*. *Clinical Advances in Periodontics*, 14(3), 192–200. <https://doi.org/10.1002/cap.10273>

Remick, D. G. (2005). *Interleukin-8: Critical Care Medicine*, 33(Suppl), S466–S467. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000186783.34908.18>

Roman, A., Soancă, A., Kasaj, A., & Stratul, S. -I. (2013). *Subepithelial connective tissue graft with or without enamel matrix derivative for the treatment of Miller class I and II gingival recessions: A controlled randomized clinical trial*. *Journal of Periodontal Research*, 48(5), 563–572. <https://doi.org/10.1111/jre.12039>

Sanadi, R. M., Jain, P. P., Nalawade, K. P., Halkai, K. R., & Halkai, R. (2020). *GINGIVAL CREVICULAR FLUID-AN UPDATE*. *IJRAR - International Journal of Research and Analytical Reviews*, 7(4), 724–730.

Sculean, A., Windisch, P., Keglevich, T., Fabi, B., Lundgren, E., & Lyngstadaas, P. (2002). *Presence of an enamel matrix protein derivative on human teeth following periodontal surgery*. *Clinical Oral Investigations*, 6(3), 183–187. <https://doi.org/10.1007/s00784-002-0171-6>

Sereti, M., Roy, M., Zekeridou, A., Gastaldi, G., & Giannopoulou, C. (2021). *Gingival crevicular fluid biomarkers in type 1 diabetes mellitus: A case-control study*. *Clinical and Experimental Dental Research*, 7(2), 170–178. <https://doi.org/10.1002/cre2.351>

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

Shirakata, Y., Nakamura, T., Shinohara, Y., Nakamura-Hasegawa, K., Hashiguchi, C., Takeuchi, N., Imafuji, T., Sculean, A., & Noguchi, K. (2019). *Split-mouth evaluation of connective tissue graft with or without enamel matrix derivative for the treatment of isolated gingival recession defects in dogs*. *Clinical Oral Investigations*, 23(8), 3339–3349. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2750-1>

Skurska, A., Dymicka-Piekarska, V., Milewski, R., & Pietruska, M. (2021). *Dynamics of Matrix Metalloproteinase-1 and -8 Secretion in Gingival Crevicular Fluid after Gingival Recession Therapy via MCAT with Either Subepithelial Connective Tissue Graft or Collagen Matrix*. *Biomolecules*, 11(5), 731. <https://doi.org/10.3390/biom11050731>

Slots J. (2013). *Periodontology: past, present, perspectives*. *Periodontology 2000*, 62(1), 7–19. <https://doi.org/10.1111/prd.12011>

Stähli, A., Imber, J. C., Raptis, E., Salvi, G. E., Eick, S., & Sculean, A. (2020). *Effect of enamel matrix derivative on wound healing following gingival recession coverage using the modified coronally advanced tunnel and subepithelial connective tissue graft: A randomised, controlled, clinical study*. *Clinical Oral Investigations*, 24(2), 1043–1051. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03008-6>

Stefanini, M., Marzadori, M., Aroca, S., Felice, P., Sangiorgi, M., & Zucchelli, G. (2018). *Decision making in root-coverage procedures for the esthetic outcome*. *Periodontology 2000*, 77(1), 54–64. <https://doi.org/10.1111/prd.12205>

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

Talebi Ardakani, M. R., Meimandi, M., Shaker, R., & Golmohammadi, S. (2019). *The Effect of Platelet-Rich Fibrin, Plasma-Rich Growth Factor, and Emdogain on Migration of Human Gingival Fibroblasts*. *Journal of Dentistry, Online First*. <https://doi.org/10.30476/dentjods.2019.44917>

Tayman, M. A., Kurgan, Ş., Önder, C., Güney, Z., Serdar, M. A., Kantarcı, A., & Günhan, M. (2019). *A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin-1 (ADAMTS-1) levels in gingival crevicular fluid correlate with vascular endothelial growth factor-A, hypoxia-inducible factor-1 α , and clinical parameters in patients with advanced periodontitis*. *Journal of periodontology*, 90(10), 1182–1189. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0195>

Tözüm, T. F., Hatipoğlu, H., Yamalik, N., Gürsel, M., Alptekin, N. Ö., Ataoğlu, T., Marakoğlu, I., Gürsoy, U. K., & Eratalay, K. (2004). *Critical steps in electronic volume quantification of gingival crevicular fluid: The potential impact of evaporation, fluid retention, local conditions and repeated measurements. Journal of Periodontal Research*, 39(5), 344–357. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00758.x>

Umeizudike, K. A., Lähteenmäki, H., Räisänen, I. T., Taylor, J. J., Preshaw, P. M., Bissett, S. M., Tervahartiala, T., O Nwhator, S., Pärnänen, P., & Sorsa, T. (2022). *Ability of matrix metalloproteinase-8 biosensor, IFMA, and ELISA immunoassays to differentiate between periodontal health, gingivitis, and periodontitis. Journal of Periodontal Research*, 57(3), 558–567. <https://doi.org/10.1111/jre.12985>

Villa, O., Wohlfahrt, J. C., Koldslund, O. C., Brookes, S. J., Lyngstadaas, S. P., Aass, A. M., & Reseland, J. E. (2016). *EMD in periodontal regenerative surgery modulates cytokine profiles: A randomised controlled clinical trial. Scientific Reports*, 6(1), 23060. <https://doi.org/10.1038/srep23060>

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>

Yadav, V. S., Gumber, B., Makker, K., Gupta, V., Tewari, N., Khanduja, P., & Yadav, R. (2023). *Global prevalence of gingival recession: A systematic review and meta-analysis. Oral Diseases*, 29(8), 2993–3002. <https://doi.org/10.1111/odi.14289>

Yadav, V. S., Makker, K., Tewari, N., Monga, N., Balachandran, R., Bhawal, U. K., & Mahajan, A. (2024). *Expression of wound healing markers in gingival crevicular fluid following root-coverage procedures: A systematic review of randomized clinical trials. Archives of oral biology*, 166, 106035. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2024.106035>

Yared, K. F. G., Zenobio, E. G., & Pacheco, W. (2006). *A etiologia multifatorial da recessão periodontal. Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial*, 11(6), 45–51. <https://doi.org/10.1590/S1415-54192006000600007>

Yuan, K., Chen, C., & Lin, M. T. (2003). *Enamel matrix derivative exhibits angiogenic effect in vitro and in a murine model*. *Journal of Clinical Periodontology*, 30(8), 732–738. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.2003.00413.x>

Zucchelli, G., & Mounssif, I. (2015). *Periodontal plastic surgery*. *Periodontology 2000*, 68(1), 333–368. <https://doi.org/10.1111/prd.12059>

Zuhr, O., Rebele, S. F., Vach, K., Petsos, H., Hürzeler, M. B., & the Research Group for Oral Soft Tissue Biology & Wound Healing. (2020). *Tunnel technique with connective tissue graft versus coronally advanced flap with enamel matrix derivate for root coverage: 2-year results of an RCT using 3D digital measuring for volumetric comparison of gingival dimensions*. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(9), 1144–1158. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13328>

9. ANEXOS

Resultados brutos do leitor de microplaca *Tecan Infinite M Plex 200 Pro* para a *IL-8*

Application: Tecan i-control		Tecan i-control , 2.0.10.0											
Device: infinite 200Pro		Serial number: 2201012381				Serial number of connected stacker:							
Firmware: V_5.31_04/18_InfiniteRX (MAI, V_5.31_04/18_InfiniteRX (Mar 28 2018/16.41.26)													
Date: 23/07/2024													
Time: 13:52:51													
System		DESKTOP-97D20MC											
User		DESKTOP-97D20MC\Lab											
Plate		BD Falcon 96 Flat Bottom Black Polystyrene Cat.No.:353219 [BD96fb_Falcon.pdfx]											
Plate-ID (Stacker)													
Label: Label1													
Mode		Fluorescence Top Reading											
Excitation Wavelength		530 nm											
Emission Wavelength		590 nm											
Excitation Bandwidth		9 nm											
Emission Bandwidth		20 nm											
Gain		93 Optimal (100%)											
Number of Flashes		6											
Integration Time		20 µs											
Lag Time		0 µs											
Settle Time		200 ms											
Z-Position (Calculated From: A12)		16490 µm											
Start Tir 23/07/2024 13:54:19													
Temperature: 27.4 °C													
<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	2852	3274	3558	4487	4401	2968	2274	2546	3708	3276	42651	43071	
B	4832	5161	1465	1417	1452	1594	5065	3926	3341	3271	1543	1652	
C	3911	3924	1445	1460	1975	2431	3628	3891	2419	2213	22681	22057	
D	2294	2496	7719	4028	4912	3793	3150	3519	2139	2160	5517	5793	
E	2282	2073	1468	1506	2857	3231	2755	4410	2086	2094	3491	3393	
F	2204	2375	14346	19669	7065	6681	6996	7920	13226	13926	2328	2344	
G	1910	1926	13594	6385	14728	10469	4017	3577	1842	2184	1705	1794	
H	2339	2496	4022	1934	3199	4210	2589	2490	1912	1912	1457	1540	

Application: Tecan i-control		Tecan i-control , 2.0.10.0											
Device: infinite 200Pro		Serial number: 2201012381				Serial number of connected stacker:							
Firmware: V_5.31_04/18_InfiniteRX (Mar 28 2018/16.41.26)		MAI, V_5.31_04/18_InfiniteRX (Mar 28 2018/16.41.26)											
Date: 31/03/2025													
Time: 14:52:57													
System		DESKTOP-97D20MC											
User		DESKTOP-97D20MC\Lab											
Plate		BD Falcon 96 Flat Bottom Black Polystyrene Cat.No.:353219 [BD96fb_Falcon.pdfx]											
Plate-ID (Stacker)													
Label: Label1													
Mode		Fluorescence Top Reading											
Excitation Wavelength		530 nm											
Emission Wavelength		590 nm											
Excitation Bandwidth		9 nm											
Emission Bandwidth		20 nm											
Gain		70 Optimal (100%)											
Number of Flashes		6											
Integration Time		20 µs											
Lag Time		0 µs											
Settle Time		200 ms											
Z-Position (Calculated From: A12)		16805 µm											
Start Time 31/03/2025 14:54:25													
Temperature: 26.3 °C													
<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	921	1152	881	934	968	759	1091	1063	973	830	5366	5640	
B	1368	1847	5024	5917	5021	5594	8758	28712	3305	3861	3263	3235	
C	1001	1084	1073	1089	875	1181	6839	7345	944	920	1887	1861	
D	902	923	1129	1088	1226	1118	2813	3178	1840	3630	1029	1229	
E	1195	1319	1279	1300	1503	1546	1326	1185	1001	963	930	886	
F	3802	4722	3289	3621	4298	5669	11429	14141	1801	2459	742	723	
G	2387	2594	1986	2228	2058	43298	3026	2461	2253	2529	771	679	
H	1726	1807	6109	6607	1874	895	1281	1358	1071	1257	610	622	

Resultados brutos do leitor de microplaca *Tecan Infinite M Plex 200 Pro* para o *VEGF*

Application: Tecan i-control		Tecan i-control , 2.0.10.0											
Device: infinite 200Pro		Serial number: 2201012381		Serial number of connected stacker:									
Firmware: V_5_31_04/18_InfiniteRX (M: MAI, V_5_31_04/18_InfiniteRX (Mar 28 2018/16.41.26)													
Date:	29/07/2024												
Time:	13:35:08												
System		DESKTOP-97D20MC											
User		DESKTOP-97D20MC\Lab											
Plate		Greiner 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene Cat. No.:655101/655161/655192 [MAG_GRE96ft.pdf]											
Plate-ID (Stacker)													
Shaking (Orbital) Duration:		60 s											
Shaking (Orbital) Amplitude:		1 mm											
Label: Label1													
Mode		Absorbance											
Measurement Wavelength		450 nm											
Bandwidth		9 nm											
Number of Flashes		25											
Settle Time		0 ms											
Start Tim		29/07/2024 13:36:08											
Temperature: 28.2 °C													
<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,4656	0,4848	0,3373	0,2787	0,4101	0,4014	0,278699994	0,265	0,445	0,363400012			
B	0,6362	0,5376	0,7727	0,6931	0,9537	0,875999987	0,497500002	0,4532	0,3302	0,296999991	2,9838	3,0973	
C	0,5046	0,517	0,9289	0,7405	0,3359	0,309500009	0,663100004	0,5588	0,3832	0,387600005	1,5773	1,6592	
D	0,408	0,4357	0,6864	0,5738	0,4518	0,445100009	0,478199989	0,4719	0,4915	0,417100012	0,9121	0,848	
E	0,2452	0,2358	0,385	0,3478	0,303	0,299100012	0,264200002	0,2456	0,3194	0,289600015	0,4902	0,5495	
F	0,5364	0,6299	0,7325	0,663	0,462	0,319999993	0,415399998	0,3826	0,7428	0,593100011	0,3327	0,3782	
G	0,4079	0,4024	0,8444	0,7419	0,6395	0,656099975	0,584800005	0,4691	0,3321	0,225400001	0,2452	0,2665	
H	0,4899	0,2576	0,5488	0,4809	0,4837	0,367799997	0,346399993	0,3102	0,4511	0,389999986	0,1797	0,1485	

Application: Tecan i-control		Tecan i-control , 2.0.10.0											
Device: infinite 200Pro		Serial number: 2201012381		Serial number of connected stacker:									
Firmware: V_5_31_04/18_InfiniteRX (Mar : MAI, V_5_31_04/18_InfiniteRX (Mar 28 2018/16.41.26)													
Date:	17/03/2025												
Time:	19:16:20												
System		DESKTOP-97D20MC											
User		DESKTOP-97D20MC\Lab											
Plate		Greiner 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene Cat. No.:655101/655161/655192 [MAG_GRE96ft.pdf]											
Plate-ID (Stacker)													
Shaking (Orbital) Duration:		60 s											
Shaking (Orbital) Amplitude:		1 mm											
Label: Label1													
Mode		Absorbance											
Measurement Wavelength		450 nm											
Bandwidth		9 nm											
Number of Flashes		25											
Settle Time		0 ms											
Start Tim		17/03/2025 19:17:20											
Temperature: 22.1 °C													
<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,1786	0,1924	0,2175	0,205	0,1558	0,1583	0,3272	0,3391	0,1961	0,2255	1,3213	1,47169995	
B	0,2746	0,2868	0,3143	0,2759	0,1938	0,1907	0,3041	0,2999	0,3245	0,3639	0,9755	0,81160003	
C	0,3014	0,3373	0,257299999	0,2436	0,1514	0,1687	0,4467	0,3537	0,1185	0,3993		0,45370001	
D	0,164	0,1513	0,1719	0,1536	0,2326	0,1925	0,1593	0,1769	0,3518	0,1666		0,41729999	
E	0,2419	0,2334	0,240899999	0,2369	0,2259	0,1728	0,1191	0,1246	0,1353	0,3184	0,1787	0,1649	
F	0,8862	0,9018	0,338099999	0,3071	0,2137	0,2338	0,3831	0,3689	0,2529	0,2704	0,1365	0,1337	
G	0,213	0,2375	0,2764	0,286	0,5145	0,5499	0,2641	0,2596	0,138	0,1554	0,1016	0,0969	
H	0,2119	0,193	0,2015	0,1426	0,1155	0,1175	0,1068	0,1688	0,3463	0,1271	0,0752	0,074	

Protocolo *ab229402* – *IL-8 in vitro CatchPoint SimpleStep ELISA*

1. Overview

IL-8 *in vitro* CatchPoint SimpleStep ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kit is designed for the quantitative measurement of IL-8 protein in human serum, plasma, and cell culture supernatant.

The CatchPoint SimpleStep ELISA employs an affinity tag labeled capture antibody and a reporter conjugated detector antibody which immunocapture the sample analyte in solution. This entire complex (capture antibody/analyte/detector antibody) is in turn immobilized via immunoaffinity of an anti-tag antibody coating the well. To perform the assay, samples or standards are added to the wells, followed by the antibody mix. After incubation, the wells are washed to remove unbound material. CatchPoint HRP Development Solution containing the Stoplight Red Substrate is added. During incubation, the substrate is catalyzed by HRP generating a fluorescent product. Signal is generated proportionally to the amount of bound analyte and the intensity is measured in a fluorescence plate reader at 530/570/590 nm Excitation/Cutoff/Emission.

IL-8 is a chemotactic factor that attracts neutrophils, basophils, and T cells, but not monocytes. It is also involved in neutrophil activation. It is released from several cell types in response to an inflammatory stimulus. IL-8(6-77) has a 5-10-fold higher activity on neutrophil activation, IL-8(5-77) has increased activity on neutrophil activation and IL-8(7-77) has a higher affinity to receptors CXCR1 and CXCR2 as compared to IL-8(1-77), respectively.

3. Precautions

Please read these instructions carefully prior to beginning the assay.

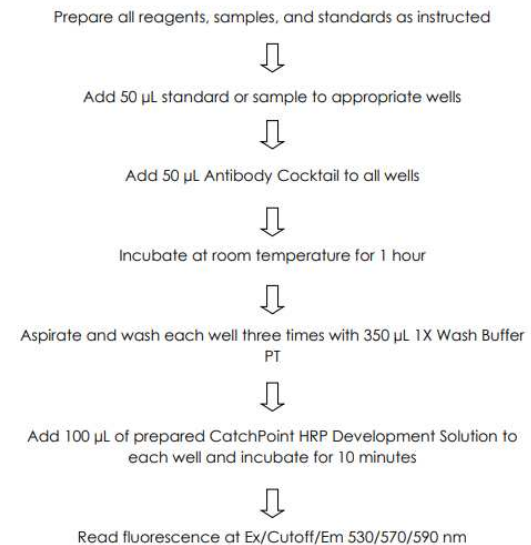
- All kit components have been formulated and quality control tested to function successfully as a kit.
- We understand that, occasionally, experimental protocols might need to be modified to meet unique experimental circumstances. However, we cannot guarantee the performance of the product outside the conditions detailed in this protocol booklet.
- Reagents should be treated as possible mutagens and should be handled with care and disposed of properly. Please review the Safety Datasheet (SDS) provided with the product for information on the specific components.
- Observe good laboratory practices. Gloves, lab coat, and protective eyewear should always be worn. Never pipet by mouth. Do not eat, drink or smoke in the laboratory areas.
- All biological materials should be treated as potentially hazardous and handled as such. They should be disposed of in accordance with established safety procedures.

4. Storage and Stability

Store kit at +4°C immediately upon receipt. Kit has a storage time of 1 year from receipt, providing components have not been reconstituted.

Refer to list of materials supplied for storage conditions of individual components. Observe the storage conditions for individual prepared components in the Materials Supplied section.

2. Protocol Summary



5. Limitations

- Assay kit intended for research use only. Not for use in diagnostic procedures.
- Do not mix or substitute reagents or materials from other kit lots or vendors. Kits are QC tested as a set of components and performance cannot be guaranteed if utilized separately or substituted.
- All data, except Typical Standard Curve and Sensitivity were collected using the colorimetric version of this kit (ab214030).

6. Materials Supplied

Item	Quantity	Storage Condition
Human IL-8 Capture Antibody 10X	600 µL	+4°C
Human IL-8 Detector Antibody 10X	600 µL	+4°C
Human IL-8 Lyophilized Recombinant Protein	2 Vials	+4°C
Antibody Diluent 4Bl	6 mL	+4°C
Wash Buffer PT 10X	20 mL	+4°C
Stoplight Red Substrate Buffer	12 mL	+4°C
100X Stoplight Red Substrate	120 µL	+4°C
500X Hydrogen Peroxide (H ₂ O ₂ , 3%)	50 µL	+4°C
Sample Diluent NS*	50 mL	+4°C
SimpleStep Pre-Coated Black 96-Well Microplate	96 Wells	+4°C
Plate Seal	1	+4°C

*Sample Diluent NS is provided but not necessary for this product.

7. Materials Required, Not Supplied

These materials are not included in the kit, but will be required to successfully perform this assay:

- Fluorescence microplate reader Ex/Cutoff/Em 530/570/590 nm.
- Method for determining protein concentration (BCA assay recommended).
- Deionized water.
- Multi- and single-channel pipettes.
- Tubes for standard dilution.
- Plate shaker for all incubation steps.
- Optional: Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) (or other protease inhibitors).

8. Technical Hints

- Samples generating values higher than the highest standard should be further diluted in the appropriate sample dilution buffers.
- Avoid foaming or bubbles when mixing or reconstituting components.
- Avoid cross contamination of samples or reagents by changing tips between sample, standard and reagent additions.
- Ensure plates are properly sealed or covered during incubation steps.
- Complete removal of all solutions and buffers during wash steps is necessary to minimize background.
- As a guide, typical ranges of sample concentration for commonly used sample types are shown below in Sample Preparation (section 11).
- All samples should be mixed thoroughly and gently.
- Avoid multiple freeze/thaw of samples.
- Incubate ELISA plates on a plate shaker during all incubation steps.
- When generating positive control samples, it is advisable to change pipette tips after each step.

10. Standard Preparation

- Always prepare a fresh set of standards for every use.
- Discard working standard dilutions after use as they do not store well.
- The following section describes the preparation of a standard curve for duplicate measurements (recommended).

10.1 IMPORTANT: If the protein standard vial has a volume identified on the label, reconstitute the IL-8 by adding that volume of Sample Diluent NS indicated on the label. Alternatively, if the vial has a mass identified, reconstitute the IL-8 standard by adding 400 µL Sample Diluent NS. Hold at room temperature for 10 minutes and mix gently. This is the 4,000 pg/mL **Stock Standard** Solution.

10.2 Label 14 tubes, Standards 1– 14.

10.3 Add 150 µL Sample Diluent NS into tube numbers 1-14.

10.4 Use the Stock Standard to prepare the following dilution series. Standard #14 contains no protein and is the Blank control.

Standards will be added to the plate in step 13.3. If desired all 14 standards can be used for a full standard curve. Alternatively, to commit fewer wells to the standard curve, select a subset of at least 7 standards plus the blank control. If 7 standards are desired, we recommend standards #4-10.

- The incubation times provided in this protocol were optimized for fastest results with good signal. It is possible to increase the signal with longer incubation times, further optimization might be necessary.
- Keep in mind any RFU values shown are relative, NOT absolute. RFU from one plate reader are not comparable to another, especially if different make or model.
- **To avoid high background always add samples or standards to the well before the addition of the antibody cocktail.**
- **This kit is sold based on number of tests. A 'test' simply refers to a single assay well. The number of wells that contain sample, control or standard will vary by product. Review the protocol completely to confirm this kit meets your requirements. Please contact our Technical Support staff with any questions.**

9. Reagent Preparation

- Equilibrate all reagents to room temperature (18-25°C) prior to use. The kit contains enough reagents for 96 wells. The sample volumes below are sufficient for 48 wells (6 x 8-well strips); adjust volumes as needed for the number of strips in your experiment.
- Prepare only as much reagent as is needed on the day of the experiment. Capture and Detector Antibodies have only been tested for stability in the provided 10X formulations.

9.1 1X Wash Buffer PT:

Prepare 1X Wash Buffer PT by diluting Wash Buffer PT 10X with deionized water. To make 50 mL 1X Wash Buffer PT combine 5 mL Wash Buffer PT 10X with 45 mL deionized water. Mix thoroughly and gently.

9.2 Antibody Cocktail:

Prepare Antibody Cocktail by diluting the capture and detector antibodies in Antibody Diluent 4BL. To make 3 mL of the Antibody Cocktail combine 300 µL 10X Capture Antibody and 300 µL 10X Detector Antibody with 2.4 mL Antibody Diluent 4BL. Mix thoroughly and gently.

9.3 CatchPoint HRP Development Solution

Just prior to use prepare CatchPoint HRP Development Solution by diluting the 100X Stoplight Red Substrate and the 500X Hydrogen Peroxide in Stoplight Red Substrate Buffer.

For example, to make 6 mL of the CatchPoint HRP Development Solution combine 60 µL 100X Stoplight Red Substrate and 12 µL of 500X Hydrogen Peroxide with 5.928 mL Stoplight Red Substrate Buffer. Mix thoroughly and gently.

Standard #	Dilution Sample	Volume to Dilute (µL)	Volume of Diluent (µL)	Starting Conc. (pg/mL)	Final Conc. (pg/mL)
1	Stock	150	150	4,000	2,000
2	Standard#1	150	150	2,000	1,000
3	Standard#2	150	150	1,000	500
4	Standard#3	150	150	500	250
5	Standard#4	150	150	250	125
6	Standard#5	150	150	125	62.5
7	Standard#6	150	150	62.5	31.25
8	Standard#7	150	150	31.25	15.63
9	Standard#8	150	150	15.63	7.81
10	Standard#9	150	150	7.81	3.91
11	Standard#10	150	150	3.91	1.95
12	Standard#11	150	150	1.95	0.98
13	Standard#12	150	150	0.98	0.49
14	None	0	150	0	0

11. Sample Preparation

Typical Sample Dynamic Range	
Sample Type	Range
Human Plasma - Heparin	50%
Human Plasma - EDTA	50%
Human Plasma - Citrate	50%
Human Serum	50%

11.1 Plasma:

Collect plasma using citrate, EDTA or heparin. Centrifuge samples at 2,000 x g for 10 minutes. Dilute samples into Sample Diluent NS and assay. Store un-diluted plasma samples at -20°C or below for up to 3 months. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

11.2 Serum:

Samples should be collected into a serum separator tube. After clot formation, centrifuge samples at 2,000 x g for 10 minutes and collect serum. Dilute samples into Sample Diluent NS and assay. Store un-diluted serum at -20°C or below. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

11.3 Cell Culture Supernatants:

Centrifuge cell culture media at 2,000 x g for 10 minutes to remove debris. Collect supernatants and assay. Or dilute samples into Sample Diluent NS and assay. Store un-diluted samples at -20°C or below. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

13. Assay Procedure

- Equilibrate all materials and prepared reagents to room temperature prior to use.
- We recommend that you assay all standards, controls and samples in duplicate.
- Prepare all reagents, working standards, and samples as directed in the previous sections.

- 13.1 Prepare all reagents, working standards, and samples as directed in the previous sections.
- 13.2 Remove excess microplate strips from the plate frame, return them to the foil pouch containing the desiccant pack, reseal and return to 4°C storage.
- 13.3 Add 50 µL of all sample or standard to appropriate wells.
- 13.4 Add 50 µL of the Antibody Cocktail to each well.
- 13.5 Seal the plate and incubate for 1 hour at room temperature on a plate shaker set to 400 rpm.
- 13.6 Wash each well with 3 x 350 µL 1X Wash Buffer PT. Wash by aspirating or decanting from wells then dispensing 350 µL 1X Wash Buffer PT into each well. Wash Buffer PT should remain in wells for at least 10 seconds. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash invert the plate and tap gently against clean paper towels to remove excess liquid.
- 13.7 Add 100 µL of prepared CatchPoint HRP Development Solution to each well and incubate for 10 minutes in the dark on a plate shaker set to 400 rpm. Further optimization of incubation time vs signal strength can be performed if needed.
- 13.8 Record the fluorescence at Ex/Cutoff/Em 530/570/590 nm. If using a Molecular Devices' plate reader supported by SoftMax® Pro software, a preconfigured protocol for these CatchPoint SimpleStep ELISA Kits is available with all the protocol and analysis settings at www.softmaxpro.org

12. Plate Preparation

- The 96 well plate strips included with this kit are supplied ready to use. It is not necessary to rinse the plate prior to adding reagents.
- Unused plate strips should be immediately returned to the foil pouch containing the desiccant pack, resealed and stored at 4°C.
- For each assay performed, a minimum of two wells must be used as the zero control.
- For statistical reasons, we recommend each sample should be assayed with a minimum of two replicates (duplicates).
- Differences in well fluorescence or "edge effects" have not been observed with this assay.
- Ensure plate and all materials are equilibrated to room temperature during use.
- Cover the plate with a plate seal during incubation steps.

Mode:	Fluorescence
Instrument settings:	Endpoint
Excitation:	530 nm
Cutoff:	570 nm
Emission:	590 nm
Sensitivity:	6 flashes/read or 200ms
PMT:	Auto
Auto calibrate:	On
Read:	Top
Read Height:	1*

*For microplate readers with Pre-Read Optimization option, the Read Height as well as Microplate Optimization is recommended before the first read.

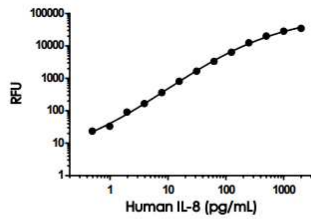
- 13.9 Analyze the data as described below.

14. Calculations

- 14.1 Preconfigured protocols are available when using SoftMax Pro software from Molecular Devices
 - 14.2 Calculate the average fluorescence value for the blank control (zero) standards. Subtract the average blank control standard fluorescence value from all other fluorescence values.
 - 14.3 **Create a standard curve** by plotting the average blank control subtracted fluorescence value for each standard concentration (y-axis) against the target protein concentration (x-axis) of the standard. Use graphing software to draw the best smooth curve through these points to construct the standard curve.
- Δ Note:** Most fluorescence reader software or graphing software will plot these values and fit a curve to the data. A four-parameter curve fit (4PL) is often the best choice; however, other algorithms (e.g. linear, semi-log, log/log, 4-parameter logistic) can also be tested to determine if it provides a better curve fit to the standard values.
- 14.4 Determine the concentration of the target protein in the sample by interpolating the blank control subtracted fluorescence **values against the standard curve**. Multiply the resulting value by the appropriate sample dilution factor, if used, to obtain the concentration of target protein in the sample.
 - 14.5 Samples generating fluorescence values greater than that of the highest standard should be further diluted and reanalyzed. Similarly, samples which measure at fluorescence values less than that of the lowest standard should be retested in a less dilute form.

15. Typical Data

Typical standard curve – data provided for demonstration purposes only. A new standard curve must be generated for each assay performed.



Concentration (pg/mL)	RFU		Mean RFU
	1	2	
0	235	235	235
0.49	261	256	259
0.98	264	274	269
1.95	322	331	327
3.91	399	404	401
7.81	601	596	599
15.63	1,037	1,061	1,049
31.25	1,864	1,938	1,901
62.5	3,540	3,614	3,577
125	6,583	6,630	6,606
250	12,680	12,807	12,744
500	20,480	20,576	20,528
1,000	28,733	29,051	28,892
2,000	35,016	35,323	35,170

Figure 1. Example of human IL-8 standard curve in Sample Diluent NS. The IL-8 standard curve was prepared as described in Section 10. Raw data generated on SpectraMax M4 Multi-Mode Microplate Reader is shown in the table. Background-subtracted data values (mean +/- SD) are graphed.

Recombinant IL-8 was spiked into the following biological samples and diluted in a 2-fold dilution series in Sample Diluent NS.

Dilution Factor	Interpolated value	50% Human Plasma (Citrate)	50% Human Plasma (EDTA)	50% Human Plasma (Heparin)
Undiluted	pg/mL	156.3	161.4	151.7
	% Expected value	100	100	100
2	pg/mL	81.1	83.0	77.9
	% Expected value	104	103	103
4	pg/mL	42.4	42.5	41.2
	% Expected value	108	105	109
8	pg/mL	21.2	20.1	20.8
	% Expected value	109	100	109
16	pg/mL	10.9	10.4	10.6
	% Expected value	112	103	112

PRECISION –

Mean coefficient of variations of interpolated values of IL-8 from three concentrations of Stimulated PBMC supernatant within the working range of the assay.

	Intra-Assay	Inter-Assay
n =	5	3
CV(%)	1.8	7.5

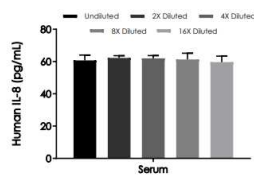


Figure 2. Interpolated concentrations of native IL-8 in human serum. The concentrations of IL-8 were measured in duplicates, interpolated from the IL-8 standard curves and corrected for sample dilution. Undiluted samples are as follows: serum 50%. The interpolated dilution factor corrected values are plotted (mean +/- SD, n=2). The mean IL-8 concentration was determined to be 63.2 pg/mL in serum.

16. Calibration

This immunoassay is calibrated against a highly purified human IL-8. The NIBSC/WHO unclassified purified human IL-8 preparation 89/520 was evaluated in this kit.

The dose response curve of the unclassified standard IL-8 parallels the CatchPoint SimpleStep ELISA kit standard curve. To convert sample values obtained with the CatchPoint SimpleStep Human IL-8 ELISA kit to approximate NIBSC IU/mL units, use the equation below.

NIBSC (89/520) approximate value (IU/mL) = 0.0042 x CatchPoint SimpleStep Human IL-8 value (pg/mL).

17. Typical Sample Values

SENSITIVITY –

The calculated minimal detectable dose (MDD) is 0.45 pg/mL. The MDD was determined by calculating the mean of zero standard replicates (n=18) and adding 2 standard deviations then extrapolating the corresponding concentration.

RECOVERY –

Three concentrations of IL-8 recombinant protein were spiked in duplicate to the indicated biological matrix to evaluate signal recovery in the working range of the assay.

Sample Type	Average % Recovery	Range (%)
50% Human serum	99	93-103
50% Human plasma - EDTA	88	84-92
50% Human plasma - citrate	86	83-90
50% Human plasma - heparin	87	82-91
50% Cell culture media	101	98-104

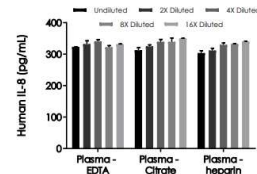


Figure 3. Interpolated concentrations of spiked IL-8 in human plasma samples. The concentrations of IL-8 were measured in duplicates, interpolated from the IL-8 standard curves and corrected for sample dilution. Undiluted samples are as follows: plasma (EDTA) 50%, plasma (citrate) 50%, and plasma (heparin) 50%. The interpolated dilution factor corrected values are plotted (mean +/- SD, n=2).

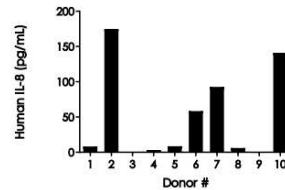


Figure 4. Serum from ten individual healthy human female donors was measured in duplicate. Interpolated dilution factor corrected values are plotted (mean +/- SD, n=2). The mean IL-8 concentration was determined to be 61.6 pg/mL with a range of 62 – 174.9 pg/mL; two individuals (Donor #3 and Donor #9) measured below the minimal detectable dose.

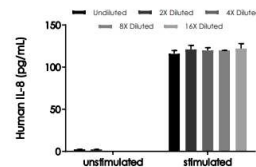


Figure 5. Interpolated concentrations of native IL-8 in human PBMC cell culture supernatant. The concentrations of IL-8 were measured in duplicates, interpolated from the IL-8 standard curves and corrected for sample dilution. Undiluted samples are as follows: unstimulated 1:400 and stimulated 1:400. The interpolated dilution factor corrected values are plotted (mean +/- SD, n=2). Measured values were interpolated from the IL-8 Standard Curve diluted in Sample Diluent NS and corrected for dilution factor. The mean IL-8 concentration was determined to be 2.2 ng/mL in unstimulated, 119.7 ng/mL in stimulated, and undetectable in media.

Protocolo ab222510 – Human VEGF SimpleStep ELISA® Kit

ab222510 – Human VEGF SimpleStep ELISA® Kit

For the quantitative measurement of VEGF in human serum, plasma [citrate], plasma [EDTA], plasma [heparin], cell culture supernatant, urine, saliva, milk, CSF, and cell extract.
For research use only - not intended for diagnostic use.

For overview, typical data and additional information please visit www.abcam.com/ab222510

This kit is available in a 384-well plate format. This plate utilizes smaller volumes of standards and samples per well. Directions for using this format can be found on pages 7-8.

Storage and Stability: Store kit at 2-8°C immediately upon receipt. Refer to list of materials supplied for storage conditions of individual components. Observe the storage conditions for individual prepared components in the Standard Preparation and Reagent preparation sections.

Materials Supplied

Item	Quantity 1 x 96 tests	Storage Condition
Human VEGF Capture Antibody 10X	600 µL	+4°C
Human VEGF Detector Antibody 10X	600 µL	+4°C
Human VEGF Lyophilized Recombinant Protein	2 Vials	+4°C
Antibody Diluent 48l	6 mL	+4°C
Cell Extraction Buffer PTR 5X	10 mL	+4°C
Cell Extraction Enhancer Solution 50X	1 mL	+4°C
Sample Diluent NS	50 mL	+4°C
Wash Buffer PT 10X	20 mL	+4°C
TMB Development Solution	12 mL	+4°C
Stop Solution	12 mL	+4°C
SimpleStep Pre-Coated 96-Well Microplate	96 wells	+4°C
Plate Seal	1	+4°C

Materials Required, Not Supplied

These materials are not included in the kit, but will be required to successfully utilize this assay:

Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 or 600 nm.
Method for determining protein concentration (BCA assay recommended).
Deionized water.
Multi- and single-channel pipettes.
Tubes for standard dilution.
Plate shaker for all incubation steps.
Optional: Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) (or other protease inhibitors).

Reagent Preparation

Equilibrate all reagents to room temperature (18-25°C) prior to use. The kit contains enough reagents for 96 wells. The sample volumes below are sufficient for 48 wells (6 x 8-well strips); adjust volumes as needed for the number of strips in your experiment.

Prepare only as much reagent as is needed on the day of the experiment. Capture and Detector Antibodies have only been tested for stability in the provided 10X formulations.

Standard #	Dilution Sample	Volume to Dilute (µL)	Volume of Diluent (µL)	Starting Conc. (pg/mL)	Final Conc. (pg/mL)
1	Stock Standard	60	240	4,000	800
2	Standard#1	150	150	800	400
3	Standard#2	150	150	400	200
4	Standard#3	150	150	200	100
5	Standard#4	150	150	100	50
6	Standard#5	150	150	50	25
7	Standard#6	150	150	25	12.5
8	Blank Control	0	150	N/A	0

Sample Preparation

Typical Sample Dynamic Range	
Sample Type	Range
Serum, Plasma	1:16 – 1:2
Milk	1:400 – 1:50
Saliva	1:256 – 1:8
Urine	1:8 – 1:2
PC-3 Cell Culture Supernatant (1 Day)	1:16 – 1:2
PC-3 Cell Culture Supernatant (2 Day)	1:32 – 1:2
HepG2 Cell Culture Supernatant	1:320 – 1:20
A549 Cell Culture Supernatant	1:32 – 1:2
MDA-MB-4355 Cell Culture Supernatant	1:128 – 1:8
A431 Cell Culture Supernatant (2 Day)	1:320 – 1:20
PHA-M Stimulated PBMC Cell Culture Supernatant (5 Day)	1:32 – 1:2
Cerebrospinal Fluid	≤ 25%
PC-3 Cell Extract (1 Day or 2 Day)	37.5 – 300 µg/mL
HepG2 Cell Extract	37.5 – 300 µg/mL
A549 Cell Extract	18.75 – 300 µg/mL
MDA-MB-4355 Cell Extract	18.75 – 300 µg/mL

The provided Cell Extraction Enhancer Solution 50X may precipitate when stored at +4°C. To dissolve, warm briefly at +37°C and mix gently. The Cell Extraction Enhancer Solution 50X can be stored at room temperature to avoid precipitation.

1X Cell Extraction Buffer PTR (For cell and tissue extracts only): Prepare 1X Cell Extraction Buffer PTR by diluting Cell Extraction Buffer PTR 5X and 50X Cell Extraction Enhancer Solution to 1X with deionized water. To make 10 mL 1X Cell Extraction Buffer PTR combine 7.8 mL deionized water, 2 mL Cell Extraction Buffer PTR 5X and 200 µL Cell Extraction Enhancer Solution 50X. Mix thoroughly and gently. If required protease inhibitors can be added.

Sample Diluent NS + 1X Enhancer (see sample preparation instructions before preparing): Prepare Sample Diluent NS + 1X Enhancer by combining Sample Diluent NS and 50X Cell Extraction Enhancer Solution. To make 5 mL Sample Diluent NS + 1X Enhancer, combine 4.9 mL Sample Diluent NS and 100 µL Cell Extraction Enhancer Solution 50X. Mix thoroughly and gently.

Sample Diluent NS + 2X Enhancer (see sample preparation instructions before preparing): Prepare Sample Diluent NS + 2X Enhancer by diluting 50X Cell Extraction Enhancer Solution to 2X with Sample Diluent NS. To make 5 mL Sample Diluent NS + 2X Enhancer, combine 4.8 mL Sample Diluent NS and 200 µL Cell Extraction Enhancer Solution 50X. Mix thoroughly and gently.

1X Wash Buffer PT: Prepare 1X Wash Buffer PT by diluting Wash Buffer PT 10X with deionized water. To make 50 mL 1X Wash Buffer PT combine 5 mL Wash Buffer PT 10X with 45 mL deionized water. Mix thoroughly and gently.

Antibody Cocktail: Prepare Antibody Cocktail by diluting the capture and detector antibodies in Antibody Diluent 48l. To make 3 mL of the Antibody Cocktail combine 300 µL 10X Capture Antibody and 300 µL 10X Detector Antibody with 2.4 mL Antibody Diluent 48l. Mix thoroughly and gently.

Standard Preparation

Always prepare a fresh set of standards for every use. Discard working standard dilutions after use as they do not store well. The following section describes the preparation of a standard curve for duplicate measurements (recommended).

- Reconstitute the VEGF standard sample by adding the volume indicated on the protein vial label. For serum, plasma, supernatant, saliva, urine, milk, and CSF samples measurements, use Sample Diluent NS + 1X Enhancer. For cell extract samples measurements, use 1X Cell Extraction Buffer PTR. Hold at room temperature for 10 minutes. Mix thoroughly and gently. This is the 4,000 pg/mL Stock Standard Solution.
- Label eight tubes, Standards 1–8.
- Use the same Sample Diluent as used to resuspend the Stock Standard to prepare the standard curve. Add 240 µL of Sample Diluent into tube number 1 and 150 µL of Sample Diluent into numbers 2-8.
- Use the Stock Standard to prepare the following dilution series. Standard #8 contains no protein and is the Blank control:

Serum Samples should be collected into a serum separator tube. After clot formation, centrifuge samples at 2,000 x g for 10 minutes and collect serum. Dilute samples 1:2 into Sample Diluent NS + 2X Enhancer and assay. Further dilutions can be made in Sample Diluent NS + 1X Enhancer. Store un-diluted serum at -20°C or below. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Plasma Collect plasma using citrate, EDTA or heparin. Centrifuge samples at 2,000 x g for 10 minutes. Dilute samples 1:2 into Sample Diluent NS + 2X Enhancer and assay. Further dilutions can be made in Sample Diluent NS + 1X Enhancer. Store un-diluted plasma samples at -20°C or below for up to 3 months. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Milk De-fat milk samples as follows. Centrifuge milk samples at 500 x g for 15 minutes at 4°C and collect the aqueous fraction using syringe attached to needle. Centrifuge the aqueous fraction at 3,000 x g for 15 minutes at 4°C and collect the final aqueous fraction (de-fatted milk) using syringe attached to needle. Dilute samples 1:50 in Sample Diluent NS + 1X Enhancer. Store un-diluted de-fatted milk at -20°C or below. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Saliva Centrifuge saliva at 800 x g for 10 minutes to remove debris. Dilute samples 1:8 in Sample Diluent NS + 1X Enhancer. Store un-diluted samples at -20°C or below. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Urine Centrifuge urine at 2,000 x g for 10 minutes to remove debris. Collect supernatants. Dilute samples 1:2 into Sample Diluent NS + 2X Enhancer and assay. Further dilutions can be made in Sample Diluent NS + 1X Enhancer. Store un-diluted samples at -20°C or below. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Cell Culture Supernatants Centrifuge cell culture media at 2,000 x g for 10 minutes to remove debris. Collect supernatants. Dilute samples 1:2 into Sample Diluent NS + 2X Enhancer and assay. Further dilutions can be made in Sample Diluent NS + 1X Enhancer. Store un-diluted samples at -20°C or below. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Cerebrospinal Fluid (CSF) Dilute cerebrospinal fluid at least 1:4 into Sample Diluent NS + 1X Enhancer and assay. Store un-diluted samples at -20°C or below. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Preparation of extracts from cell pellets Collect non-adherent cells by centrifugation or scrape to collect adherent cells from the culture flask. Typical centrifugation conditions for cells are 500 x g for 5 minutes at 4°C. Rinse cells twice with PBS. Solubilize pellet at 2x10⁷ cell/mL in chilled 1X Cell Extraction Buffer PTR. Incubate on ice for 20 minutes. Centrifuge at 18,000 x g for 20 minutes at 4°C. Transfer the supernatants into clean tubes and discard the pellets. Assay samples immediately or aliquot and store at -80°C. The sample protein concentration in the extract may be quantified using a protein assay. Dilute samples to desired concentration in 1X Cell Extraction Buffer PTR.

Preparation of extracts from adherent cells by direct lysis (alternative protocol) Remove growth media and rinse adherent cells 2 times in PBS. Solubilize the cells by addition of chilled 1X Cell Extraction Buffer PTR directly to the plate (use 750 µL – 1.5 mL 1X Cell Extraction Buffer PTR per confluent 15 cm diameter plate). Scrape the cells into a microfuge tube and incubate the lysate on ice for 15 minutes. Centrifuge at 18,000 x g for 20 minutes at 4°C. Transfer the supernatants into clean tubes and discard the pellets. Assay samples immediately or aliquot and store at -80°C. The sample protein concentration in the extract may be quantified using a protein assay. Dilute samples to desired concentration in 1X Cell Extraction Buffer PTR.

Preparation of extracts from tissue homogenates Tissue lysates are typically prepared by homogenization of tissue that is first minced and thoroughly rinsed in PBS to remove blood (ounce homogenizer recommended). Homogenize 100 to 200 mg of wet tissue in 500 µL – 1 mL of chilled 1X Cell Extraction Buffer PTR. For lower amounts of tissue adjust volumes accordingly. Incubate on ice for 20 minutes. Centrifuge at 18,000 x g for 20 minutes at 4°C. Transfer the supernatants into clean tubes and discard the pellets. Assay samples immediately or aliquot and store at -80°C. The sample protein concentration in the extract may be quantified using a protein assay. Dilute samples to desired concentration in 1X Cell Extraction Buffer PTR.

Análise da variação de parâmetros bioquímicos no recobrimento radicular com proteínas derivadas da matriz de esmalte associado a enxerto de tecido conjuntivo

Plate Preparation

The 96 well plate strips included with this kit are supplied ready to use. It is not necessary to rinse the plate prior to adding reagents. Unused plate strips should be immediately returned to the foil pouch containing the desiccant pack, resealed and stored at 4°C. For each assay performed, a minimum of two wells must be used as the zero control. For statistical reasons, we recommend each sample should be assayed with a minimum of two replicates (duplicates). Differences in well absorbance or "edge effects" have not been observed with this assay.

Assay Procedure

Equilibrate all materials and prepared reagents to room temperature prior to use. We recommend that you assay all standards, controls and samples in duplicate.

1. Prepare all reagents, working standards, and samples as directed in the previous sections.
2. Remove excess microplate strips from the plate frame, return them to the foil pouch containing the desiccant pack, reseal and return to 4°C storage.
3. Add 50 µL of all sample or standard to appropriate wells.
4. Add 50 µL of the Antibody Cocktail to each well.
5. Seal the plate and incubate for 1 hour at room temperature on a plate shaker set to 400 rpm.
6. Wash each well with 3 x 350 µL 1X Wash Buffer PT. Wash by aspirating or decanting from wells then dispensing 350 µL 1X Wash Buffer PT into each well. Wash Buffer PT should remain in wells for at least 10 seconds. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash invert the plate and tap gently against clean paper towels to remove excess liquid.
7. Add 100 µL of TMB Development Solution to each well and incubate for 10 minutes in the dark on a plate shaker set to 400 rpm.
Given variability in laboratory environmental conditions, optimal incubation time may vary between 5 and 20 minutes.
Note: The addition of Stop Solution will change the color from blue to yellow and enhance the signal intensity about 3X. To avoid signal saturation, proceed to the next step before the high concentration of the standard reaches a blue color of O.D.600 equal to 1.0.
8. Add 100 µL of Stop Solution to each well. Shake plate on a plate shaker for 1 minute to mix. Record the OD at 450 nm. This is an endpoint reading.
9. Alternative to 7 – 8: Instead of the endpoint reading at 450 nm, record the development of TMB Substrate kinetically. Immediately after addition of TMB Development Solution begin recording the blue color development with elapsed time in the microplate reader prepared with the following settings:

Mode	Kinetic
Wavelength:	600 nm
Time:	up to 20 min
Interval:	20 sec - 1 min
Shaking:	Shake between readings

Note that an endpoint reading can also be recorded at the completion of the kinetic read by adding 100 µL Stop Solution to each well and recording the OD at 450 nm.

ab222510 – Human VEGF SimpleStep ELISA® Kit Additional information

ASSAY SPECIFICITY

This kit is designed for the quantification of human VEGF.

The standard protein in this kit is mature full length human VEGF165 [isoform 4].

Native signal was detected in serum, plasma (citrate), plasma (EDTA), plasma (heparin), cell culture supernatant, urine, saliva, milk, and cell extract sample types.

Spiked protein experiments were used to validate in serum, plasma (citrate), plasma (EDTA), plasma (heparin), and CSF sample types.

Tissue extract samples have not been tested with this kit.

CROSS REACTIVITY

Serial dilutions of recombinant human VEGF189 and VEGF121 were prepared and assayed in parallel with recombinant VEGF165 and cross reactivity was observed.

INTERFERENCE

Serial dilutions of recombinant human VEGFR1, VEGFR2, and VEGFR3 were prepared starting at 4 ng/mL and tested for interference. No interference was observed.

SPECIES REACTIVITY

Species reactivity was tested by measuring 500 pg/mL of recombinant mouse, rat, and canine VEGF. Reactivity was as follows: 13% (mouse), 24% (rat), and 110% (canine).

Other species reactivity was determined by measuring 1:2 serum samples of various species, interpolating the protein concentrations from the human standard curve, and expressing the interpolated concentrations as a percentage of the protein concentration in human serum assayed at the same dilution. Reactivity was as follows: pig 20%, guinea pig 3.4% and canine 28%. No signal was observed with 1:2 serum samples from the following species: Rabbit, hamster, rat, and mouse.

Non-human primate cross-reactivity was determined by measuring 1:2 plasma samples of various species, interpolating the protein concentrations from the human standard curve, and expressing the interpolated concentrations as a percentage of the protein concentration in human plasma assayed at the same dilution. Reactivity was as follows: rhesus macaque 29% and cynomolgus macaque 60%.

Other species reactivity not determined.

CALIBRATION

This immunoassay is calibrated against a highly purified human VEGF. The NIBSC/WHO unclassified purified human VEGF preparation 02/286 was evaluated in this kit.

The dose response curve of the unclassified standard 02/286 parallels the SimpleStep standard curve. To convert sample values obtained with the SimpleStep human VEGF kit to approximate NIBSC 02/286 units, use the equation below.

NIBSC 02/286 approximate value (IU/mL) = 0.0011 x SimpleStep human VEGF value (pg/mL).

Download our ELISA guide for technical hints, results, calculation, and troubleshooting tips: www.abcam.com/protocols/the-complete-elisa-guide

For technical support contact information, visit: www.abcam.com/contactus

Copyright © 2024 Abcam. All Rights Reserved. All information / detail is correct at time of going to print. Version 4a | 2024-10-24

CALCULATION

- Calculate the average absorbance value for the blank control (zero) standards. Subtract the average blank control standard absorbance value from all other absorbance values.
- Create a standard curve by plotting the average blank control subtracted absorbance value for each standard concentration (y-axis) against the target protein concentration (x-axis) of the standard. Use graphing software to draw the best smooth curve through these points to construct the standard curve.
Δ Note: Most microplate reader software or graphing software will plot these values and fit a curve to the data. A four-parameter curve fit (4PL) is often the best choice; however, other algorithms (e.g., linear, semi-log, log/log, 4-parameter logistic) can also be tested to determine if it provides a better curve fit to the standard values.
- Determine the concentration of the target protein in the sample by interpolating the blank control subtracted absorbance values against the standard curve. Multiply the resulting value by the appropriate sample dilution factor, if used, to obtain the concentration of target protein in the sample.
- Samples generating absorbance values greater than that of the highest standard should be further diluted and reanalyzed. Similarly, samples which measure at absorbance values less than that of the lowest standard should be retested in a less dilute form.

TYPICAL DATA

Typical standard curve – data provided for demonstration purposes only. A new standard curve must be generated for each assay performed.

Concentration (pg/mL)	Standard Curve Measurements		Mean O.D.
	1	2	
0	0.104	0.100	0.102
12.5	0.236	0.221	0.229
25	0.345	0.332	0.338
50	0.558	0.540	0.549
100	0.962	0.940	0.951
200	1.740	1.750	1.745
400	3.068	2.987	3.027
800	3.959	3.954	3.957

Table 1. Example of human VEGF standard curve in Sample Diluent NS + 1X Enhancer. The VEGF standard curve was prepared as described in the Standard Preparation section. The table shows raw data values.

Standard Curve Measurements			
Concentration (pg/ml)	O.D. 450 nm		Mean O.D.
	1	2	
0	0.101	0.099	0.100
12.5	0.207	0.192	0.199
25	0.304	0.284	0.294
50	0.495	0.467	0.481
100	0.853	0.805	0.829
200	1.547	1.425	1.486
400	2.879	2.634	2.757
800	3.962	3.895	3.928

Table 2. Example of human VEGF standard curve in 1X Cell Extraction Buffer PTR. The VEGF standard curve was prepared as described in the Standard Preparation section. The table shows raw data values.

TYPICAL SAMPLE VALUES

Sensitivity:

The minimal detectable dose (MDD) was determined by calculating the mean of zero standard replicates and adding 2 standard deviations then extrapolating the corresponding concentration.

Sample Diluent Buffer	N=	Minimal Detectable Dose
Sample Diluent NS + 1X Enhancer	14	2.7 pg/mL
1X Cell Extraction Buffer PTR	10	2.9 pg/mL

Recovery

Three concentrations of VEGF were spiked into the indicated biological matrix to evaluate signal recovery in the working range of the assay.

Sample Type	Average % Recovery	Range (%)
50% Serum	107	98 - 116
50% Plasma (Citrate)	101	95 - 107
50% Plasma (Heparin)	89	84 - 92
50% Plasma (EDTA)	98	95 - 99
25% Urine	95	91 - 102
1:400 Breast Milk (de-fatted)	95	91 - 98
2% Saliva	109	105 - 118
50% Cell Culture Media*	86	81 - 89
25% Cerebrospinal Fluid	92	89 - 95
150 µg/mL PC-3 Cell Extract (2 Day)	89	80 - 94
75 µg/mL MDA-MB-4355 Cell Extract	104	82 - 126

*Media is HGMEM containing 10% fetal bovine serum.

Linearity of Dilution

Linearity of dilution is determined based on interpolated values from the standard curve. Linearity of dilution defines a sample concentration interval in which interpolated target concentrations are directly proportional to sample dilution.

Recombinant human VEGF was spiked into the following biological samples and diluted in a 2-fold dilution series in Sample Diluent NS + 2X Enhancer and in Sample Diluent NS + 1X Enhancer, see Sample Preparation section for details.

Dilution Factor	Interpolated value	50% Human Serum	50% Human Plasma (Citrate)	50% Human Plasma (EDTA)	50% Human Plasma (Heparin)	25% CSF
Undiluted	pg/mL	692.8	698.8	675.6	665.3	384.5
	% Expected value	100	100	100	100	100
2	pg/mL	365.0	366.1	353.1	332.2	409.0
	% Expected value	105	105	105	100	106
4	pg/mL	166.5	179.0	168.8	166.3	360.6
	% Expected value	96	102	100	100	94
8	pg/mL	75.20	72.75	67.96	80.28	427.1
	% Expected value	87	83	80	97	111
16	pg/mL	34.83	34.80	38.87	41.28	407.3
	% Expected value	80	80	92	99	106

Native VEGF was measured in the following biological samples in a 2-fold dilution series. Sample dilutions are made in Sample Diluent NS + 2X Enhancer and in Sample Diluent NS + 1X Enhancer, see Sample Preparation section for details.

Dilution Factor	Interpolated value	2% Human Breast Milk	12.5% Human Saliva	50% Human Urine	20% PC-3 (1 Day) SN	20% PC-3 (2 Day) SN
Undiluted	pg/mL	461.4	497.3	127.4	123.8	294.4
	% Expected value	100	100	100	100	100
2	pg/mL	187.1	250.2	68.12	69.22	156.5
	% Expected value	81	101	107	112	106
4	pg/mL	96.03	118.3	32.34	35.23	71.87
	% Expected value	83	95	102	114	98
8	pg/mL	56.86	53.86	ND	18.31	39.46
	% Expected value	99	87	ND	118	107
16	pg/mL	29.63	26.14	ND	ND	17.81
	% Expected value	103	84	ND	ND	97

ND – Not Detected – below product dynamic range

Native VEGF was measured in the following biological samples in a 2-fold dilution series. Sample dilutions are made in Sample Diluent NS + 2X Enhancer and in Sample Diluent NS + 1X Enhancer, see Sample Preparation section for details.

Dilution Factor	Interpolated value	50% A549 SN	12.5% MDA-MB-4355 SN	5% HepG2 SN	5% A431 SN	50% PHA-M PBMG SN (5 Day)
Undiluted	pg/mL	325.8	696.7	245.2	384.6	191.2
	% Expected value	100	100	100	100	100
2	pg/mL	145.3	409.8	125.1	161.1	97.32
	% Expected value	89	118	102	84	102
4	pg/mL	73.49	186.7	61.51	79.70	51.17
	% Expected value	90	107	100	83	107
8	pg/mL	37.53	81.58	32.11	49.70	26.66
	% Expected value	92	94	105	103	112
16	pg/mL	18.61	48.93	16.16	25.98	13.10
	% Expected value	91	112	105	108	110

Native VEGF was measured in the following biological samples in a 2-fold dilution series. Sample dilutions are made in 1X Cell Extraction Buffer PTR.

Dilution Factor	Interpolated value	300 µg/mL PC-3 Cell Extract (1 Day)	300 µg/mL PC-3 Cell Extract (2 Day)	300 µg/mL HepG2 Cell Extract	300 µg/mL A549 Cell Extract	300 µg/mL MDA-MB-4355 Cell Extract
Undiluted	pg/mL	85.16	143.9	119.0	232.5	451.4
	% Expected value	100	100	100	100	100
2	pg/mL	41.55	70.46	59.64	117.1	213.3
	% Expected value	98	98	100	101	95
4	pg/mL	20.77	35.78	33.36	61.19	107.2
	% Expected value	98	99	112	105	95
8	pg/mL	11.90	21.31	17.39	31.75	58.03
	% Expected value	112	118	117	109	103
16	pg/mL	ND	ND	ND	15.19	31.34
	% Expected value	ND	ND	ND	105	111

ND – Not Detected – below product dynamic range

Precision

Mean coefficient of variations of interpolated values of VEGF from three concentrations of A431 cell culture supernatant within the working range of the assay.

	Intra-assay	Inter-assay
N=	5	3
CV (%)	5.4	5.5

Download our ELISA guide for technical hints, results, calculation, and troubleshooting tips: www.abcam.com/protocols/the-complete-elisa-guide

For technical support contact information, visit: www.abcam.com/contact-us

Copyright © 2024 Abcam. All Rights Reserved. All information / detail is correct at time of going to print. Version 4a | 2024-10-24

Documento de aprovação pela Comissão de Ética



Comissão de Ética EGAS MONIZ

PT-255/23

Processo Interno nº1358

Ex.ma Senhora

Axel Alexis Arnaud Aissou

Monte de Caparica, 27 de fevereiro de 2024.

Ex.ma Senhora,

Em resposta ao Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado: "Recobrimento radicular por técnica de retalho de avanço coronal, com autoenxerto de tecido conjuntivo, com e sem proteínas derivadas da matriz de esmalte: Ensaio clínico controlado randomizado", foi aprovado.

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Profª Doutora Cidália de Castro