

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

NÍVEIS DE NITRITO NA SALIVA E A SUA CORRELAÇÃO COM A SEVERIDADE DA DOENÇA PERIODONTAL E OS VALORES DE TENSÃO ARTERIAL

Trabalho submetido por
Inês Silva Gomes
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2023

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

NÍVEIS DE NITRITO NA SALIVA E A SUA CORRELAÇÃO COM A SEVERIDADE DA DOENÇA PERIODONTAL E OS VALORES DE TENSÃO ARTERIAL

Trabalho submetido por
Inês Silva Gomes
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Maria Gabriela Almeida

e coorientado por
Prof. Doutor Ricardo Alves

outubro de 2023

A life lived in fear is a life half lived.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof. Doutora Maria Gabriela Almeida, pela disponibilidade, motivação e ajuda ao longo de todo este trabalho. O meu sincero agradecimento.

Ao meu coorientador, Prof. Doutor Ricardo Alves, pelo apoio, incentivo e vasto conhecimento transmitido.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz e a todo o corpo docente, por terem feito parte desta etapa final e por terem sido um pilar fundamental na minha formação.

À minha mãe e ao meu pai, um especial agradecimento por toda a motivação, carinho e eterna paciência ao longo destes 5 anos. Obrigada por nunca me terem deixado desistir.

À minha irmã, por ser uma inspiração e por acreditar sempre em mim.

À Sara e ao Leonel, por toda a ajuda, todas as horas dedicadas e todas as palavras de encorajamento e ensinamentos transmitidos.

À Marta, a melhor parceira de box que podia ter pedido, foi um prazer ter tido a oportunidade de trabalhar com alguém como tu. Obrigada pela eterna amizade.

Aos meus amigos, Jorge, João, Marco, Carolina e Verónica por me terem acolhido todas as tardes, por terem ouvido as minhas queixas e pela motivação constante. Sem vocês ainda nem tinha começado.

À minha querida equipa de Dentisteria das terças-feiras, por me terem dado motivos para me rir todas as semanas e por me terem ensinado o verdadeiro sentido da palavra equipa. A terça-feira será para sempre o meu dia preferido da semana. Um agradecimento especial à professora Filipa, por ter acreditado em mim desde o primeiro dia.

Por fim, um agradecimento eterno à Laura e à Mariana, por terem feito este percurso comigo, por terem rido e chorado comigo e por serem sempre a minha casa longe de casa.

Obrigada a todos.

RESUMO

Objetivo: Estudar a correlação entre a concentração de nitritos (NO_2^-) na saliva, a severidade da doença periodontal (DP) e os valores de pressão arterial por comparação de dois grupos de estudo constituídos por pacientes com e sem DP.

Materiais e Métodos: Foram selecionados 45 pacientes da Clínica Dentária Egas Moniz, que cumpriam cumulativamente os critérios de inclusão e exclusão propostos, aos quais foram aplicados consentimentos informados e questionários, foi medida a pressão arterial (PA) e recolhidas amostras de 2mL de saliva não estimulada. As amostras foram posteriormente analisadas com recurso ao biossensor NO2Probe, obtendo-se assim a concentração de nitrito para cada indivíduo. Numa amostra mais restrita, foi ainda avaliada a resposta de brancos não enzimáticos. Após análise dos dados obtidos, foram ainda aplicados dois critérios de exclusão analíticos adicionais, o que reduziu a amostra a 34 participantes. Os resultados finais foram analisados estatisticamente. Adicionalmente, testou-se um protocolo de quantificação de nitratos na saliva com utilização do NO2Probe.

Resultados: Comparando os valores de concentração de nitrito em saliva de indivíduos diagnosticados com e sem DP, não foi possível estabelecer diferenças estatisticamente significativas. Embora estes resultados sejam ainda preliminares, isto pode ser indicativo de ausência de correlação entre os níveis de nitrito na saliva e a DP. Na análise comparativa dos valores de concentração de nitrito com os valores de PA, não foi possível estabelecer qualquer tendência entre os dois. No entanto, ao associarmos os valores de tensão com a presença ou ausência de DP, os pacientes comprometidos apresentaram níveis de tensão arterial mais elevados, apesar de os valores obtidos não serem estatisticamente diferentes.

Conclusão: No futuro deve-se ponderar correlacionar os valores de concentrações de nitrito com outros fatores, tais como a dieta, os valores de nitrito circulante na corrente sanguínea, a microflora e os valores de nitrato.

Palavras-chave: Doença Periodontal, Nitrito, Hipertensão Arterial, Saliva.

ABSTRACT

Objective: To study the correlation between the concentration of nitrite in the saliva, the severity of periodontal disease and the blood pressure values by comparing two study groups made up of patients with and without periodontal disease.

Materials and Methods: Forty-five patients from the Egas Moniz Dental Clinic who met the proposed inclusion and exclusion criteria were selected and given informed consent and questionnaires, their blood pressure was measured and 2mL samples of unstimulated saliva were taken. The samples were then analysed using the NO₂Probe biosensor, thus obtaining the nitrite concentration for each individual. In a more restricted sample, the response of non-enzymatic blanks was also evaluated. After analysing the data obtained, two additional analytical exclusion criteria were applied, which reduced the sample to 34 participants. The final results were analysed statistically. In addition, a protocol for quantifying nitrates in saliva was tested using the NO₂Probe.

Results: Comparing the nitrite concentration values in the saliva of individuals diagnosed with and without periodontal disease, it was not possible to establish statistically significant differences. Although these results are still preliminary, this may indicate that there is no correlation between nitrite levels in saliva and periodontal disease. When comparing nitrite concentration values with blood pressure values, it was not possible to establish any trend between the two. However, when we associated blood pressure values with the presence or absence of periodontal disease, the compromised patients had higher blood pressure levels, although the values obtained were not statistically different.

Conclusion: In the future, consideration should be given to correlating nitrite concentration values with other factors, such as diet, circulating nitrite values in the bloodstream, microflora and nitrate values.

Keywords: Periodontal Disease, Nitrite, Hypertension, Saliva.

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	13
1. ANATOMIA DO PERIODONTO	13
1.1 PERIODONTO	13
1.2 GENGIVA	14
1.3 LIGAMENTO PERIODONTAL	15
1.4 CEMENTO.....	16
1.5 OSSO ALVEOLAR.....	16
2. DOENÇA PERIODONTAL	17
2.1 ETIOLOGIA	17
2.2 MECANISMO DA DOENÇA	18
2.3 FATORES DE RISCO	20
2.4 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO.....	20
3. OXIDO NÍTRICO	23
3.1 PAPEL FISIOLÓGICO	23
3.2 BIODISSÍNTESE.....	25
3.2.1 VIA L-ARGININA – N.O [•] SINTASE.....	25
3.2.2 VIA NITRATO – NITRITO – OXIDO NÍTRICO	26
3.3 A INFLUÊNCIA DA DIETA E DA MICROFLORA ORAL NAS CONCENTRAÇÕES DE NITRITO NA SALIVA	27
3.4 DOENÇA PERIODONTAL E O OXIDO NÍTRICO	29
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO E NITRATO	30
3.5.1. MÉTODO TRADICIONAL	30
3.5.2 BIODIAGNÓSTICOS	31
4. HIPERTENSÃO ARTERIAL	32
4.1 ETIOLOGIA	32
4.2 FATORES DE RISCO.....	33

4.3 CLASSIFICAÇÃO.....	33
5. CORRELAÇÃO ENTRE DP, HTA E NÍVEIS MÉDIOS DE NITRITO	35
II. OBJETIVOS	37
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
1. ESTUDO CLÍNICO.....	39
1.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	39
1.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	39
1.2.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	39
1.2.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	39
1.3. RECOLHA DE DADOS	40
1.4. RECOLHA DAS AMOSTRAS.....	41
2. QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO E NITRATO	41
2.1. PREPARAÇÃO DO BIOSSENSOR NO2PROBE	41
2.2. MÉTODO DE GRIESS.....	43
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4. MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS.....	44
4.1. REAGENTES E SOLUÇÕES	44
4.2. EQUIPAMENTOS	45
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
1. ANÁLISE DEMOGRÁFICA DA AMOSTRA	47
2. VALORES DE NITRITO E A DOENÇA PERIODONTAL.....	48
3. VALORES DE NITRITO E HTA	52
4. DOENÇA PERIODONTAL E HTA.....	53
5. QUANTIFICAÇÃO DE NITRATO RECORRENDO AO BIOSSENSOR NO2PROBE – RESULTADOS PRELIMINARES.....	55
V. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	57
VII. BIBLIOGRAFIA	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia do periodonto.	13
Figura 2 - Detalhe dos tecidos periodontais O compartimento superior do periodonto é constituído pela gengiva. O compartimento inferior é constituído pelo cimento, ligamento periodontal e osso alveolar.	14
Figura 3 - Evolução da doença periodontal.	18
Figura 4 – Mecanismos das respostas inatas e adaptativas na doença periodontal. A reabsorção óssea alveolar característica da periodontite é o resultado de reações imunológicas inatas e adaptativas (Adaptado de Kinane et al., 2017). A fase inicial da reação imunológica aos agentes patogénicos, é a mobilização de células imunitárias inatas, incluindo neutrófilos e monócitos, para a área infetada. As células imunológicas adaptativas são mais facilmente recrutadas quando as citocinas e os mediadores pró-inflamatórios (IL-1, IL-8, TNF) são libertados pelo epitélio gengival, sendo a sua libertação induzida por macrófagos e células dendríticas. Posteriormente, as células dendríticas são capazes de ligar a imunidade inata à imunidade adquirida, processando antígenos que serão reconhecidos pelas células T (Junxian et al., 2022). As células imunes adaptativas primárias envolvidas na defesa do hospedeiro contra a DP são as células T CD4+ (Campbell et al., 2016). As células T reguladoras, também conhecidas como <i>Tregs</i> , são um subconjunto especializado de células T CD4 + que, ao manter a homeostase e a autotolerância por meio da expressão de citocinas imunossupressoras (IL-4, IL-10, IL-12, TGFβ, IFNγ) modulam a reação imunológica. Além disso, as <i>Tregs</i> inibem a função das células B, que controlam com sucesso as reações imunológicas humorais do hospedeiro através da expressão de anticorpos (Junxian et al., 2022).....	19
Figura 5 – Funções do NO· nos diversos sistemas fisiológicos.	24
Figura 6 - Biossíntese de NO· segundo a via da L-arginina.	25
Figura 7 - Vias endógenas para produção de NO· (Adaptado de Lundberg et al., 2008).	26
Figura 8 - Correlação entre o nitrato ingerido na dieta, as bactérias comensais orais e a regulação da pressão arterial (Adaptado de Pignatelli et al., 2020).	28
Figura 9 - Esquematização do processo experimental.	40

Figura 10 - Sistema de três elétrodos impresso, composto por um (1) eletrodo de trabalho de carbono, um (2) contra eletrodo de carbono e um (3) pseudo-eletrodo de referência de Ag.....	42
Figura 11 - Esquema pormenorizado de um ccNiR/GOxCat/PVA/SPE. O eletrodo de trabalho (camada preta) é modificado através da deposição de duas camadas de enzimas diferentes. A primeira camada é composta por ccNiR que converte o NO ₂ ⁻ em NH ₄ ⁺ . A camada seguinte é constituída pelo sistema absorvente de oxigénio GOxCat, que catalisa a reação de redução do O ₂ em água (Adaptado de Monteiro et al., 2019).	42
Figura 12 - Critérios de exclusão de amostras.....	49
Figura 13 - Valores de NO ₂ ⁻ para o grupo de estudo e para o grupo de controlo.	50
Figura 14 - Distribuição de participantes de acordo com o grau de HTA.	54

As figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 foram feitas com recurso à ferramenta BioRender.com.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Nova classificação do estadió das doenças periodontais e peri-implantares (Adaptado de Costa et al., 2020).	22
Tabela 2 - Nova classificação do grau das doenças periodontais e peri-implantares (Adaptado de Costa et al., 2020).	23
Tabela 3 - Limites de referência da pressão arterial para o diagnóstico de hipertensão arterial.....	34
Tabela 4 - Distribuição da amostra de acordo com o género.....	47
Tabela 5 - Distribuição da amostra de acordo com a faixa etária.	47
Tabela 6 - Média de corrente de dois ensaios para valores padronizados de NO_2^-	48
Tabela 7 – Intensidade de corrente dos brancos obtidos com amostras de saliva e com solução tampão.	51
Tabela 8 - Concentrações de nitrito em função do grau de HTA.....	52
Tabela 9 - Concentração de NO_3^- quantificadas segundo o método de Griess e com recurso ao biossensor NO2Probe.....	55

LISTA DE SIGLAS

AAP – Academia Americana de Periodontologia

BOP – Hemorragia à sondagem (do inglês, *bleeding on probing*)

CAL – Perda de inserção (do inglês, *clinical attachment loss*)

Cat – Catalase

ccNiR – Redutase do nitrito do citocromo c

CE – Contra elétrodo

DCV – Doença cardiovascular

DGS – Direção Geral de Saúde

DP – Doença periodontal

EFP – Federação Europeia de Periodontologia

eNOS – NOS endotelial

GC – Grupo de controlo

GE – Grupo de estudo

GOx – Glucose oxidase

HTA – Hipertensão arterial

IL – interleucinas

iNOS – NOS induzível

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NED – Dihidrocloreto de N-(1-naftil) etileno diamina

nNOS – NOS neuronal

NOS – Sintase do óxido nítrico

NR – Redutase do nitrato

PA – Pressão Arterial

PAD – Pressão arterial diastólica

PAS – Pressão arterial sistólica

PPD – Profundidade de sondagem (do inglês, *probing pocket depth*)

PVA – Álcool Polivinílico (do inglês, *polyvinyl alcohol*)

SPE – Eléttodos impressos (do inglês, *screen printed electrode*)

TNF – Fator de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor*)

WE – Eléttodo de trabalho (do inglês, *working electrode*)

I. INTRODUÇÃO

1. ANATOMIA DO PERIODONTO

1.1 PERIODONTO

O periodonto (peri = em torno de; odonto = dente) é uma unidade biológica e funcional que é provida ao longo da vida por um arranjo vascular único, um sistema linfático e uma rede altamente especializada de elementos nervosos (Hassell, 1993; Lindhe et al., 2015).

Este encontra-se em constante adaptação, sofrendo algumas alterações com a idade e estando sujeito a alterações morfológicas relacionadas com modificações funcionais da cavidade oral (Lindhe et al., 2015).

Na sua composição estão presentes os seguintes elementos: gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar (figura 1). Destes, apenas a gengiva é visível clinicamente aquando da realização de um exame intra-oral da cavidade oral (Hassell, 1993).

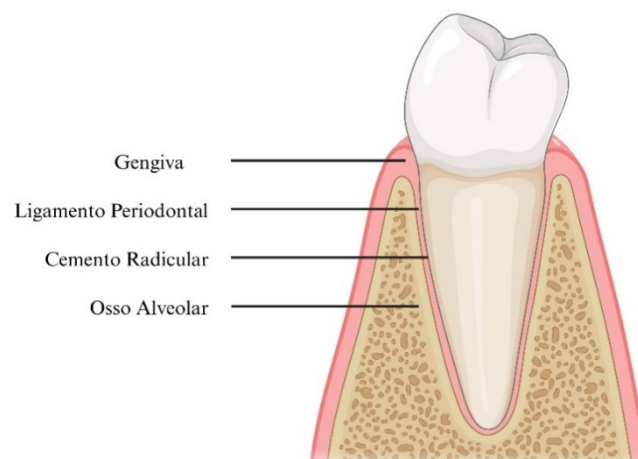


Figura 1 - Anatomia do periodonto.

A principal função do periodonto é a de união do dente ao osso da maxila e da mandíbula, auxiliando ainda no suporte e transformação das forças geradas pela mastigação, fonação e deglutição. Concomitantemente, é responsável pela criação de uma barreira de separação entre o meio externo e o meio interno, atuando não só como defesa contra agentes externos nocivos, mas também regulando as alterações estruturais

associadas ao uso e envelhecimento por meio de uma remodelação e regeneração contínuas (Lindhe et al., 2015).

É então crucial compreender que cada um dos componentes periodontais tem uma estrutura muito especializada e que o funcionamento adequado do periodonto só é conseguido através da integridade estrutural e da interação entre os seus constituintes (Nanci & Bosshardt, 2006).

1.2 GENGIVA

A mucosa oral é contínua com a pele dos lábios e com a mucosa do palato mole e da faringe. Esta compreende: a mucosa mastigatória, que inclui a gengiva e o revestimento do palato duro e a mucosa especializada, que recobre o dorso da língua e a mucosa de revestimento (Lindhe et al., 2015).

A gengiva integra então a mucosa mastigatória que cobre o processo alveolar e circunda a porção cervical dos dentes. Esta última compreende uma camada de tecido epitelial e outra de tecido conjuntivo e pode ainda ser dividida em: gengiva livre, e gengiva aderida, que se continua com a mucosa alveolar, como podemos observar na figura 2 (Lindhe et al., 2015).

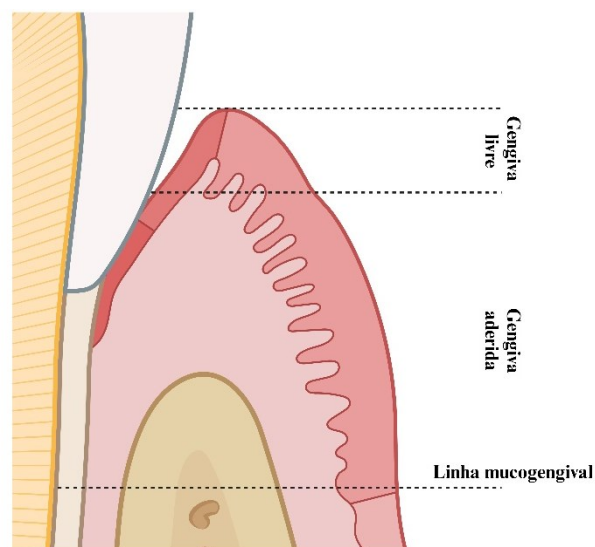


Figura 2 - Detalhe dos tecidos periodontais O compartimento superior do periodonto é constituído pela gengiva. O compartimento inferior é constituído pelo cimento, ligamento periodontal e osso alveolar.

A gengiva aderida estende-se até à linha mucogengival, onde se funde com a mucosa alveolar. A sua textura é dura, a cor é rosa, o contorno festoneado e a sua superfície apresenta geralmente pequenas depressões, conferindo-lhe uma textura de casca de laranja ou “*stippling*” (Hassell, 1993; Lindhe et al., 2015).

A gengiva livre é de cor rosa, tem a superfície opaca com contorno festoneado e consistência firme. Numa situação em que se verifique a presença de saúde periodontal, no seu limite cervical, é formado um sulco gengival de aproximadamente 1,5 a 2 mm de profundidade, uma vez que há um contato íntimo com a superfície do esmalte. (Hassell, 1993; Lindhe et al., 2015).

1.3 LIGAMENTO PERIODONTAL

O ligamento periodontal é composto por tecido conjuntivo laxo, ricamente vascularizado e celular (tendo na sua constituição elementos tais como: fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos, osteoclastos, células epiteliais e fibras nervosas), que circunda as raízes dos dentes e une o cemento radicular à lâmina dura ou ao osso alveolar propriamente dito. A sua largura varia entre 0,15 e 0,38 mm, estando a sua parte mais fina localizada em redor do terço médio da raiz, havendo uma diminuição progressiva desta espessura com a idade (Nanci & Bosshardt, 2006; Lindhe et al., 2015).

Esta estrutura, em conjunto com os seus constituintes, desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase do segmento alveolar do periodonto. As células deste ligamento têm a capacidade de sintetizar e reabsorver as macromoléculas dos tecidos conjuntivos e, por conseguinte, contribuem para a regulação da síntese e reabsorção da matriz extracelular do ligamento periodontal, bem como do osso alveolar e do cemento (Hassell, 1993). Este é ainda responsável pela ancoragem dos dentes nos seus alvéolos e, auxilia na distribuição e absorção das forças geradas durante a mastigação e oclusão (Nanci & Bosshardt, 2006); Lindhe et al., 2015).

As patologias ou traumas associadas a este e outros componentes do periodonto são atualmente responsáveis por uma grande percentagem das perdas dentárias na população adulta dos países desenvolvidos (Hassell, 1993).

1.4 CEMENTO

O cimento é o tecido conjuntivo duro e avascular que reveste as superfícies das raízes dos dentes e é o principal responsável pelo seu revestimento e fixação (Nanci & Bosshardt, 2006). Esta função é assegurada pelos feixes de fibras de colagénio do ligamento periodontal, cujas terminações (fibras de Sharpey) ficam firmemente incorporadas no cimento durante o processo de cementogénese (Hassell, 1993).

O cimento pode ainda ser classificado como fibrilar ou afibrilar, com base na presença ou ausência de células no seu interior e na origem das fibras de colagénio da matriz (Nanci & Bosshardt, 2006). Embora a deposição deste componente do periodonto seja contínua ao longo da vida, ao contrário do que acontece com o processo alveolar, não é linear que exista uma relação direta ou previsível entre a espessura do cimento e as forças funcionais suportadas pelos dentes (Hassell, 1993).

1.5 OSSO ALVEOLAR

O processo alveolar é constituído pelas placas corticais externas (vestibular, lingual e palatina) de osso compacto, por osso esponjoso central e osso que reveste os alvéolos dentários (osso alveolar) (Nanci & Bosshardt, 2006).

O osso alveolar propriamente dito, juntamente com o cimento e o ligamento periodontal, formam o tecido periodontal, e sua principal função é distribuir as forças geradas, por exemplo, pela mastigação e oclusão dentária (Lindhe et al., 2015).

A presença de osso alveolar ao longo de toda a extensão do alvéolo separa anatómica e funcionalmente o osso de suporte do ligamento periodontal. A organização do processo alveolar é outro exemplo da relação estrutura-função no periodonto (Nanci & Bosshardt, 2006).

A ocorrência generalizada de doenças periodontais e a percepção de que os tecidos perdidos podem ser reparados e, talvez, regenerados, gerou um interesse considerável nos fatores e células que regulam a sua formação e manutenção (Nanci & Bosshardt, 2006).

2. DOENÇA PERIODONTAL

2.1 ETIOLOGIA

O termo doença periodontal abrange um vasto leque de condições inflamatórias que afetam as estruturas de suporte dos dentes (gengiva, osso e ligamento periodontal), o que pode levar à perda de dentes e contribuir para a inflamação sistémica do organismo, exacerbando condições como a diabetes *mellitus* e a hipertensão arterial (HTA) (Nanci & Bosshardt, 2006; Kinane et al., 2017).

Esta afeta aproximadamente 19% da população com mais de 15 anos a nível mundial, estimando-se que haja mais de 1 bilião de casos e em Portugal, no ano de 2019, a prevalência desta patologia encontrava-se entre os 10.6% e os 19.6% (WHO, 2022).

Em estados iniciais esta apresenta-se frequentemente como gengivite, que se caracteriza pela presença de hemorragia, gengivas inchadas e dor, e, se não for tratada, pode progredir para periodontite, que envolve a perda da inserção periodontal e do osso de suporte (Nanci & Bosshardt, 2006; M. Nazir et al., 2020).

Embora sejam iniciadas e mantidas pelo biofilme microbiano da placa dentária, tendo uma etiopatogénese semelhante, os fatores genéticos e ambientais do hospedeiro influenciam a incidência destas doenças (Kinane et al., 2017).

A deteção precoce desempenha um papel importante na sua prevenção e progressão e o seu diagnóstico e classificação baseiam-se essencialmente na avaliação de parâmetros clínicos. No entanto, os avanços na biologia molecular e na genética estão a levar a uma melhor compreensão das vias e mecanismos através dos quais as bactérias mantêm a resposta imunitária/inflamatória do hospedeiro. Novas ferramentas de diagnóstico adjuvantes baseadas na análise de fluidos, como a saliva e o fluido crevicular gengival, bem como estudos da microflora subgengival e da suscetibilidade genética, são úteis e devem continuar a ser desenvolvidas (Reher et al., 2007; Ramenzoni et al., 2021). Neste contexto, a saliva tem sido amplamente estudada no contexto da doença periodontal, uma vez que é fácil de recolher em contexto clínico e permite a análise de vários marcadores de inflamação locais e/ou sistémicos (eritrócitos, leucócitos, urobilinogénio, nitritos, glicose, bilirrubina e cetonas) (Reher et al., 2007; Ramenzoni et al., 2021).

2.2 MECANISMO DA DOENÇA

O conhecimento de como os mecanismos imunitários e as respostas inflamatórias são regulados é fundamental para compreender a patogênese de doenças complexas como a periodontite, uma vez que estes regem a suscetibilidade dos indivíduos à mesma, podendo também ser afetados por diversos fatores comportamentais, ambientais e genéticos (Cekici et al., 2014; Silva et al., 2015).

A doença periodontal, no seu estado inicial, é caracterizada como gengivite, uma inflamação reversível e localizada nas gengivas, causada pelas bactérias provenientes da placa dentária (um biofilme microbiano que se forma nos dentes e nas gengivas). Como podemos observar na figura 3, a periodontite, por sua vez, desenvolve-se quando a gengivite não tratada progride e ocorre a perda de gengiva, osso e ligamento, dando origem à formação de bolsas periodontais profundas que podem eventualmente levar à perda de inserção dentária e culminar com a perda de dentes (Kinane et al., 2017).

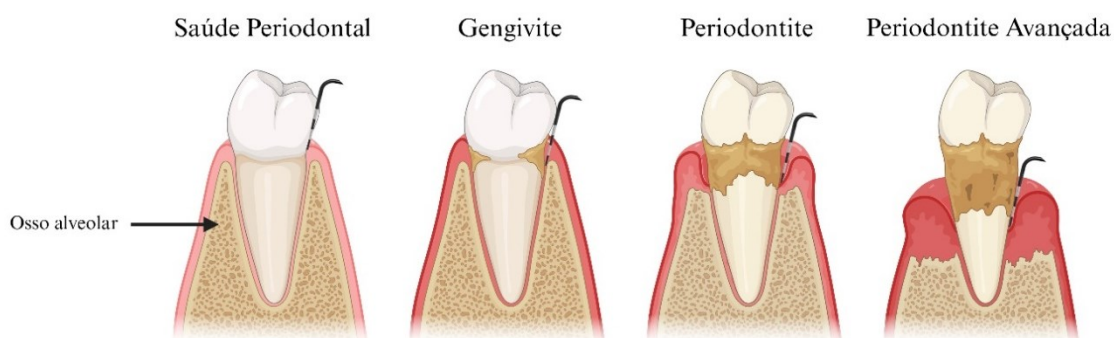


Figura 3 - Evolução da doença periodontal.

Esta patologia advém então de uma interação complexa entre a infecção bacteriana e a resposta imune do hospedeiro, contudo, o facto de esta se desenvolver em diferentes graus em diferentes indivíduos sugere uma etiologia multifatorial (Nanci & Bosshardt, 2006; M. A. Nazir, 2017).

No entanto, todas as formas da doença periodontal parecem partilhar um conjunto comum de eventos subjacentes, nomeadamente os possíveis agentes patogénicos envolvidos neste processo, os quais incluem bactérias anaeróbias gram-negativas, tais como: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, que desencadeiam reações de carácter inflamatório (Nanci & Bosshardt, 2006; Silva et al., 2015; Kinane et al., 2017).

As interações entre o hospedeiro e o agente patogénico (figura 4) que ocorrem na bolsa periodontal são caracterizadas pela infiltração de neutrófilos e granulócitos (células polimorfonucleares) impulsionada por gradientes quimiotáticos bacterianos e pela resposta inflamatória e infiltração de linfócitos T e B que ocorre após o reconhecimento de antígenos por parte de células dendríticas. Há então a criação de um meio propício à inflamação, que inclui citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF), as interleucinas, o interferão- γ (IFN γ) e o fator de crescimento transformador- β (TGF β), bem como anticorpos criados contra os componentes do biofilme (Kinane et al., 2017).

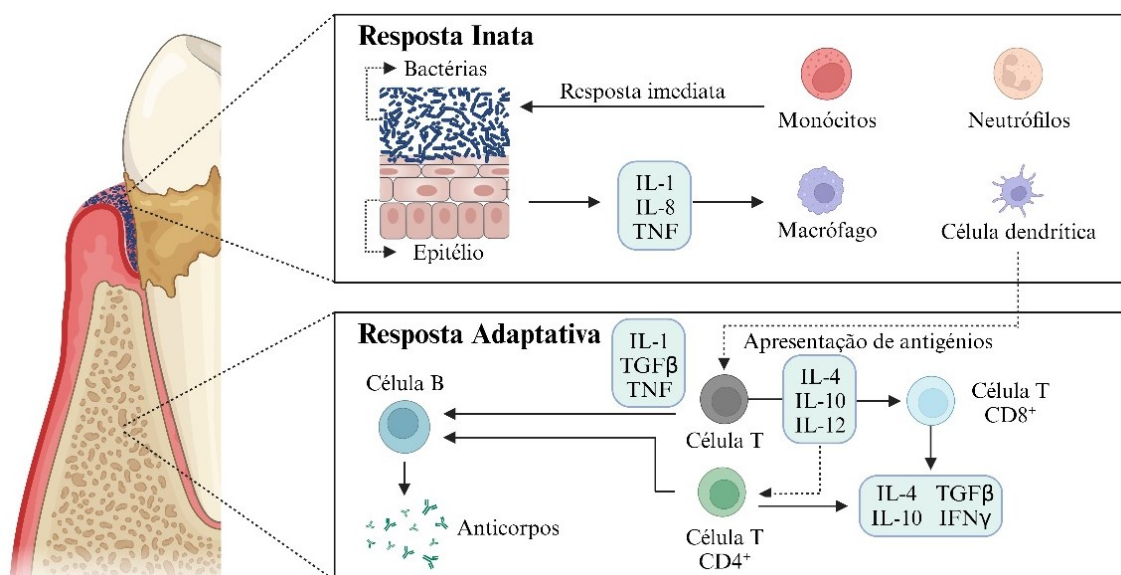


Figura 4 – Mecanismos das respostas inatas e adaptativas na doença periodontal. A reabsorção óssea alveolar característica da periodontite é o resultado de reações imunológicas inatas e adaptativas (Adaptado de Kinane et al., 2017). A fase inicial da reação imunológica aos agentes patogénicos, é a mobilização de células imunitárias inatas, incluindo neutrófilos e monócitos, para a área infetada. As células imunológicas adaptativas são mais facilmente recrutadas quando as citocinas e os mediadores pró-inflamatórios (IL-1, IL-8, TNF) são libertados pelo epitélio gengival, sendo a sua libertação induzida por macrófagos e células dendríticas. Posteriormente, as células dendríticas são capazes de ligar a imunidade inata à imunidade adquirida, processando antígenos que serão reconhecidos pelas células T (Junxian et al., 2022). As células imunes adaptativas primárias envolvidas na defesa do hospedeiro contra a DP são as células T CD4⁺ (Campbell et al., 2016). As células T reguladoras, também conhecidas como *Tregs*, são um subconjunto especializado de células T CD4⁺ que, ao manter a homeostase e a autotolerância por meio da expressão de citocinas imunossupressoras (IL-4, IL-10, IL-12, TGF β , IFN γ) modulam a reação imunológica. Além disso, as *Tregs* inibem a função das células B, que controlam com sucesso as reações imunológicas humorais do hospedeiro através da expressão de anticorpos (Junxian et al., 2022).

2.3 FATORES DE RISCO

Os fatores de risco desempenham um papel importante na resposta de um indivíduo à doença periodontal e a identificação destes ajuda a orientar e consciencializar os pacientes para a importância da prevenção, tratamento e modificação de hábitos nocivos no controlo da doença periodontal (Genco & Borgnakke, 2013).

Vários fatores de risco modificáveis como o tabagismo, a má higiene oral, a medicação, e o *stress*, estão atualmente descritos na literatura como estando associados à doença periodontal. No entanto, há também há alguns fatores sistémicos como a diabetes *mellitus* e doenças cardiovasculares que podem estabelecer uma relação bidirecional com a patologia em causa, podendo ser considerados potenciadores da mesma (M. A. Nazir, 2017; Liccardo et al., 2019).

A elevada prevalência da DP em adolescentes, adultos e idosos tornam esta patologia num problema de saúde pública pelo que é imperativo prosseguir com estudos científicos que visem identificar os fatores genéticos associados à mesma, de forma a que possam ser tomadas medidas no que toca à prevenção dos grupos de indivíduos mais suscetíveis (Genco & Borgnakke, 2013; M. A. Nazir, 2017).

2.4 DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO

Os métodos tradicionais de avaliação clínica periodontal, como a profundidade de sondagem da bolsa (PPD), a hemorragia à sondagem (BOP), o nível de inserção clínica (CAL) e a avaliação radiográfica do nível ósseo alveolar, são amplamente utilizados no diagnóstico e classificação da doença periodontal (Ramenzoni et al., 2021).

No entanto, estes parâmetros tradicionais de classificação periodontal não fornecem informações significativas sobre a atividade atual da doença, a gravidade e a extensão da destruição, a progressão futura e a resposta ao tratamento. Mais importante ainda, o fenótipo biológico do paciente não é refletido adequadamente pelos métodos de avaliação clínica, e a resposta do hospedeiro às bactérias periodontais e a subsequente carga inflamatória, ou seja, a influência do fenótipo biológico, podem determinar em

grande medida a progressão da periodontite (Ramenzoni et al., 2021). Por conseguinte, os desenvolvimentos científicos contínuos no campo da periodontologia levaram a uma reformulação do sistema de classificação, de forma a corrigir as deficiências da classificação anterior (Costa et al., 2020).

Esta nova classificação (tabelas 1 e 2) é o resultado de extensa pesquisa e conhecimento do estado da arte, possui propriedades dinâmicas com excelente adaptabilidade e foi projetada para ser implementada não apenas em ambientes clínicos, mas também em contextos de pesquisa epidemiológica (Costa et al., 2020).

A revisão do novo sistema de classificação das doenças periodontais e peri-implantares foi liderada pela Academia Americana de Periodontologia (AAP) e pela Federação Europeia de Periodontologia (EFP) no evento de novembro de 2017 "World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions" em Chicago (Costa et al., 2020).

A nova classificação periodontal inclui parâmetros multidimensionais de estádios e graus que permitem uma avaliação parcial do risco periodontal futuro e, embora fatores como o tabagismo e a diabetes estejam incluídos para prever a probabilidade de progressão da doença, ainda não é possível determinar o momento exato da manifestação da doença. Por conseguinte, a adição de biomarcadores mais robustos ao novo sistema de classificação melhorará a identificação dos períodos ativos da periodontite, monitorizará a progressão e evitará a subsequente má gestão do tratamento periodontal (Ramenzoni et al., 2021).

Tabela 1 - Nova classificação do estadios das doenças periodontais e peri-implantares (Adaptado de Costa et al., 2020).

Estadio da Periodontite		Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
Severidade	CAL interproximal	1 a 2 mm	3 a 4 mm	≥5 mm	≥5 mm
	Perda óssea RX	1/3 coronal (<15%)	1/3 coronal (15-30%)	Extensão a ½ ou ao terço apical da raiz	Extensão a ½ ou ao terço apical da raiz
	Perda dentária	Não existe perda dentária devido à periodontite		≤4 dentes perdidos devido à periodontite	≥5 dentes perdidos devido à periodontite
Complexidade	Local	- Profundidade de sondagem máxima ≤ 4 mm	- Profundidade de sondagem máxima ≤ 5 mm	- PS ≥ 6 mm - Perda óssea vertical ≥ 3 mm	<u>Adicional ao estadio III de complexidade:</u> Necessidade de reabilitação complexa por: - Disfunção mastigatória - Trauma oclusal 2º (mobilidade ≥2) - Defeitos de crista severos
		- Perda óssea predominantemente horizontal	- Perda óssea predominantemente horizontal	- Defeitos de furca (II ou III) - Defeitos de crista moderados	- Colapso de mordida, má posição dentária, migração patológica - < 20 dentes remanescentes
Extensão e distribuição		Para cada estadio descreve-se a extensão como localizada (<30% dos dentes envolvidos), generalizada (>30% dos dentes envolvidos), ou padrão molar/incisivos			

Tabela 2 - Nova classificação do grau das doenças periodontais e peri-implantares (Adaptado de Costa et al., 2020).

Grau de Periodontite			Grau A	Grau B	Grau C
Critérios Primários	Evidência direta de progressão	<u>Informação longitudinal</u> (perda óssea RX ou CAL)	Evidência de nenhuma perda em 5 anos	< 2 mm em 5 anos	≥ 2 mm em 5 anos
	Evidência indireta de progressão	<u>% perda óssea/idade</u>	<0,25	0,25 a 1	>1
		<u>Fenótipo do caso</u>	Depósitos densos de biofilme com níveis baixos de destruição	Destruição proporcional com os depósitos de biofilme	Destruição excede o que seria expectável com os depósitos de biofilme / padrões clínicos específicos sugestivos de períodos de rápida progressão e/ou doença de início precoce
Modificadores de Grau	Fatores de risco	<u>Hábitos tabágicos</u>	Não fumador	< 10 cigarros/dia	
		<u>Diabetes</u>	Normoglicémico	HbA1c <7% em diabéticos	HbA1c ≥ 7% em diabéticos

3. OXIDO NÍTRICO

3.1 PAPEL FISIOLÓGICO

O óxido nítrico (NO·) é um produto com um curto tempo de semivida resultante do metabolismo do azoto. Este tem muitas propriedades características dos radicais livres oxidantes e pode, portanto, influenciar várias reações celulares e funções biológicas, sendo uma importante molécula de sinalização celular (Aurer et al., 2001; Qu et al., 2016).

As células endoteliais e neuronais produzem $\text{NO}\cdot$, enquanto os macrófagos e outras células inflamatórias podem induzir a sua síntese e libertação em processos de defesa contra infeções bacterianas (Aurer et al., 2001). Podemos então afirmar que este composto tem uma atividade antimicrobiana e tem um papel fisiológico nos sistemas cardiovascular, neurológico e imunitário (figura 5), mediando a vasodilatação dos vasos sanguíneos, a neurotransmissão e a supressão de agentes patogénicos (Madan & Rao, 1996; Aurer et al., 2001; Ghasemi, 2022).

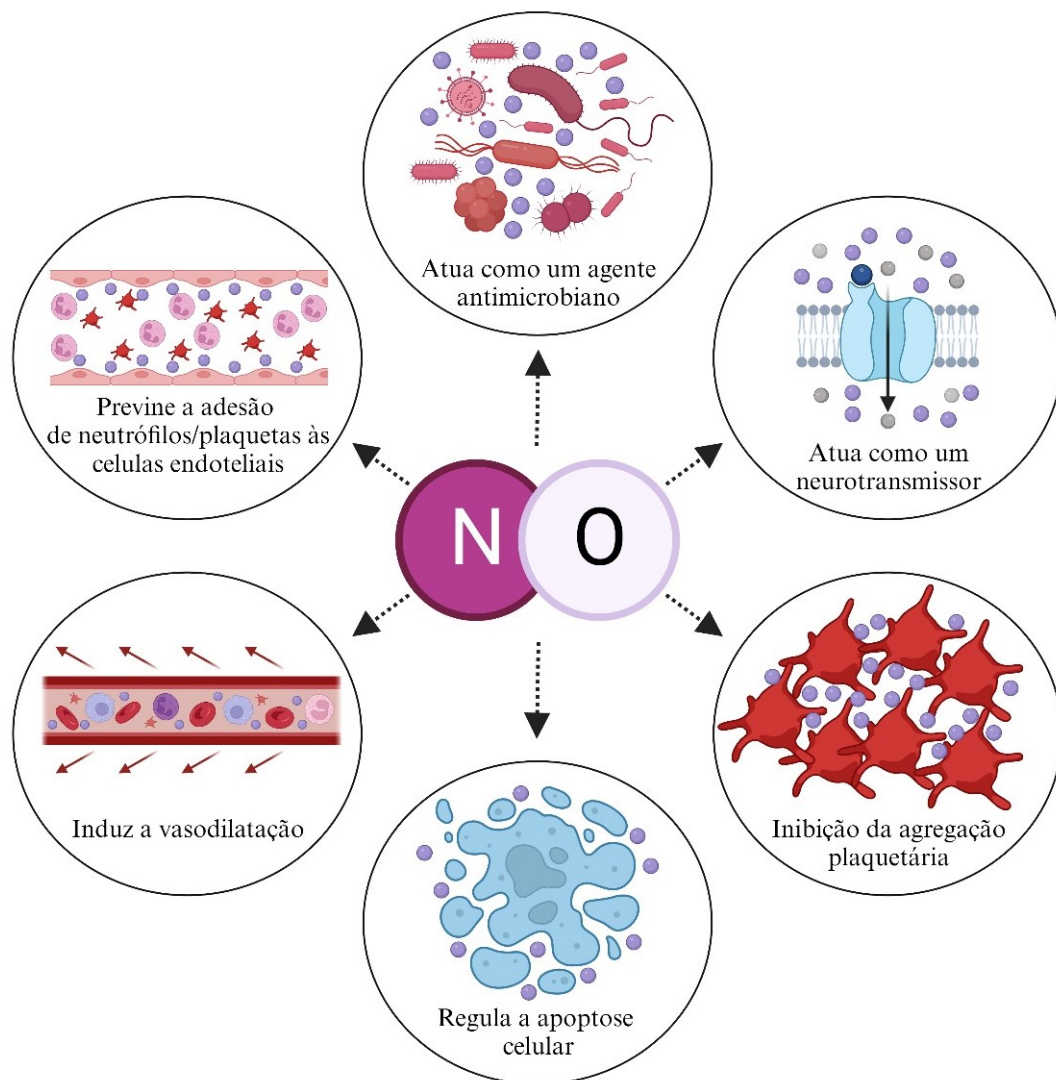


Figura 5 – Funções do $\text{NO}\cdot$ nos diversos sistemas fisiológicos.

A sua produção a nível endógeno tem 2 vias principais: (1) a via L-arginina- $\text{NO}\cdot$ sintase e (2) a via nitrato-nitrito- $\text{NO}\cdot$. Contudo, o $\text{NO}\cdot$ também pode ser obtido

indiretamente por meio da dieta, sendo esta última considerada uma fonte exógena do mesmo (Ghasemi, 2022).

3.2 BIOSSÍNTESE

3.2.1 VIA L-ARGININA – N.O· SINTASE

O NO· é sintetizado a partir da L-arginina numa reação catalisada por um conjunto de enzimas da sintase do óxido nítrico (NOS). A conversão da L-arginina em NO e L-citrulina em quantidades equimolares também requer Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) e O₂ como co substratos (figura 6) e (6R)-tetrahydrobiopterina (BH₄), FAD, FMN e proto porfirina IX de ferro (heme) como cofatores (Korhonen et al., 2005; Ghasemi, 2022).

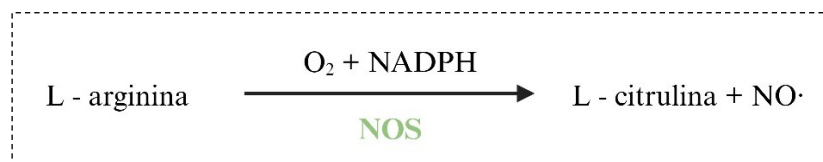


Figura 6 - Biossíntese de NO· segundo a via da L-arginina.

Foram identificadas três isoformas diferentes de NOS. A NOS neuronal (nNOS) é expressa predominantemente nos neurónios do cérebro e do sistema nervoso periférico; a NOS endotelial (eNOS) é expressa principalmente nas células endoteliais e ambas desempenham um papel importante na regulação de processos fisiológicos como a agregação plaquetária, o relaxamento vascular e a modulação imunitária (Korhonen et al., 2005; Sukuroglu et al., 2015).

A NOS induzível (iNOS) produz grandes quantidades de NO e é expressa em resposta a endotoxinas bacterianas e citocinas, como a interleucina-1 β e o TNF- α . Ao contrário da eNOS e da nNOS, pensa-se que a iNOS atua em condições patológicas e desempenha um papel prejudicial na regulação das respostas inflamatórias (Sukuroglu et al., 2015).

A via L-arginina-NO \cdot sintase é dependente de oxigénio, enquanto a via nitrato-nitrito-NO \cdot é progressivamente ativada à medida que a tensão de oxigénio diminui. Neste sentido, a formação de NO \cdot independente da NOS pode ser vista como um sistema de reserva para garantir a formação de NO \cdot quando o fornecimento de oxigénio é limitado, como podemos observar pelo esquema representado na figura 7 (Lundberg et al., 2008).

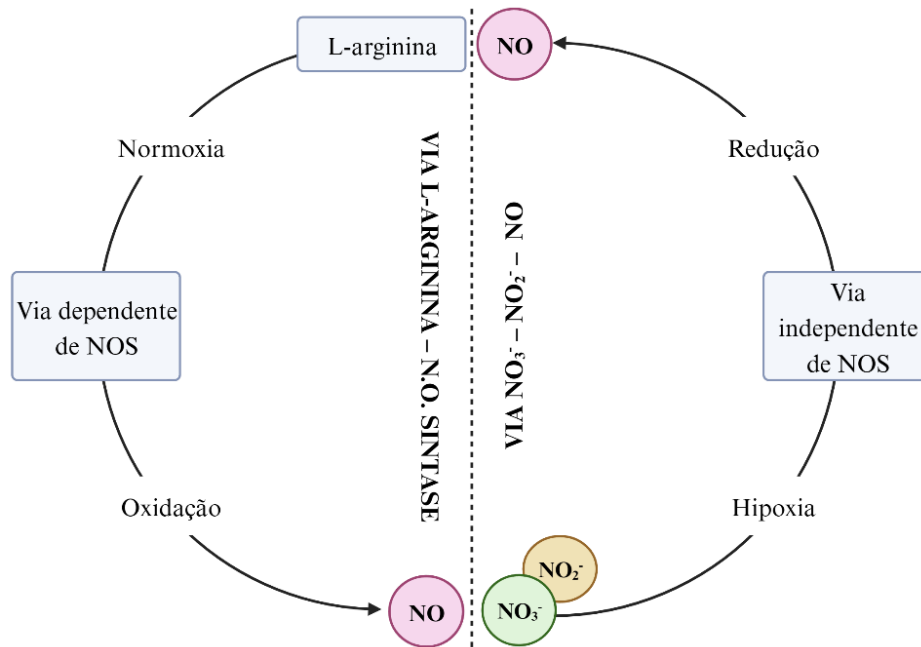


Figura 7 - Vias endógenas para produção de NO \cdot (Adaptado de Lundberg et al., 2008).

3.2.2 VIA NITRATO – NITRITO – ÓXIDO NÍTRICO

No final do século XX, pensava-se que os aniões nitrato (NO $_3^-$) e nitrito (NO $_2^-$) eram simples produtos oxidativos estáveis do metabolismo endógeno do óxido nítrico. No entanto, na viragem do milénio, vários estudos mostraram que estes iões podem ser reciclados *in vivo* para formar NO \cdot , pela via nitrato-nitrito-NO \cdot , constituindo assim uma importante fonte desta molécula, em alternativa à via clássica descrita anteriormente (Lundberg et al., 2008). O nitrato e o nitrito de origem exógena, podem também atuar como fontes de NO \cdot , pelo que os aspetos nutricionais da via nitrato-nitrito-NO \cdot são de grande importância (Ghasemi, 2022).

A bio ativação do nitrato proveniente de fontes alimentares ou endógenas requer a sua redução inicial a nitrito e, uma vez que os mamíferos não dispõem de enzimas

reduzoras de nitrato específicas e eficazes, esta conversão é efetuada principalmente por bactérias comensais no trato gastrointestinal e na cavidade oral, através da ação de redutases do nitrato (Lundberg et al., 2008; Ashworth et al., 2019).

O nitrito é único entre os óxidos de azoto pela sua posição redox entre a sinalização oxidativa (radical NO_2) e redutora (radical $\text{NO}\cdot$), e pela sua relativa estabilidade no sangue e nos tecidos. Uma vez formado o nitrito, existem inúmeras vias no organismo para a sua posterior redução a $\text{NO}\cdot$, envolvendo hemoglobina, mioglobina, xantina oxirredutase, ascorbato, polifenóis e protões (Lundberg et al., 2008).

Esta via é cada vez mais reconhecida como um mediador vital para regular o fluxo sanguíneo, a sinalização celular, a produção de energia e as respostas dos tecidos à hipoxia, assegurando assim a produção de $\text{NO}\cdot$ em situações em que as atividades das enzimas NOS dependentes do oxigénio estão comprometidas (Lundberg et al., 2008; Lundberg et al., 2009).

3.3 A INFLUÊNCIA DA DIETA E DA MICROFLORA ORAL NAS CONCENTRAÇÕES DE NITRITO NA SALIVA

A dieta é considerada a maior fonte de exposição a nitritos e nitratos e apesar de o ser humano não possuir a capacidade enzimática de reduzir o nitrato a nitrito após este ser ingerido, a literatura demonstra que as bactérias anaeróbias facultativas comensais presentes na superfície posterior da língua catalisam uma reação de redução através da ação de enzimas nitrato redutase, desempenhando assim um papel importante na manutenção da homeostase do $\text{NO}\cdot$ (Bryan, 2015; Qu et al., 2016; Pignatelli et al., 2020).

Podemos considerar as seguintes estirpes como as mais relevantes neste mecanismo: *Rothia*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Kingella* e *Propionibacterium*. Atualmente, considera-se que a inibição das bactérias orais com colutórios antibacterianos perturba fortemente a produção de $\text{NO}\cdot$ por meio da via nitrato-nitrito- $\text{NO}\cdot$, o que provoca uma redução significativa nos níveis plasmáticos de nitrito (Ashworth et al., 2019; Rosier et al., 2022).

Os dois aniões em questão surgem naturalmente em certos alimentos, especialmente nos vegetais de folha verde, como a rúcula, os espinafres, a couve e certos tipos de alface, bem como a beterraba, pelo que os produtos hortícolas contribuem com mais de 80% da sua ingestão alimentar diária, sendo considerados a principal fonte de exposição humana a estes compostos (Bryan, 2015; Ashworth et al., 2019). Os sais de nitritos e nitratos são também utilizados como aditivos alimentares em carnes curadas e processadas, podendo ainda ser encontrados na água, muito embora esta última contribua menos de 5% para a sua ingestão total (Ashworth et al., 2019).

Apesar dos papéis fisiológicos do nitrato e do nitrito na função vascular e imunitária, a consideração das fontes alimentares destes elementos está ainda pouco presente na literatura, todavia, esta pode trazer benefícios, como efeitos anti-hipertensivos, como podemos ver esquematizado na figura 8 (Hord et al., 2009).

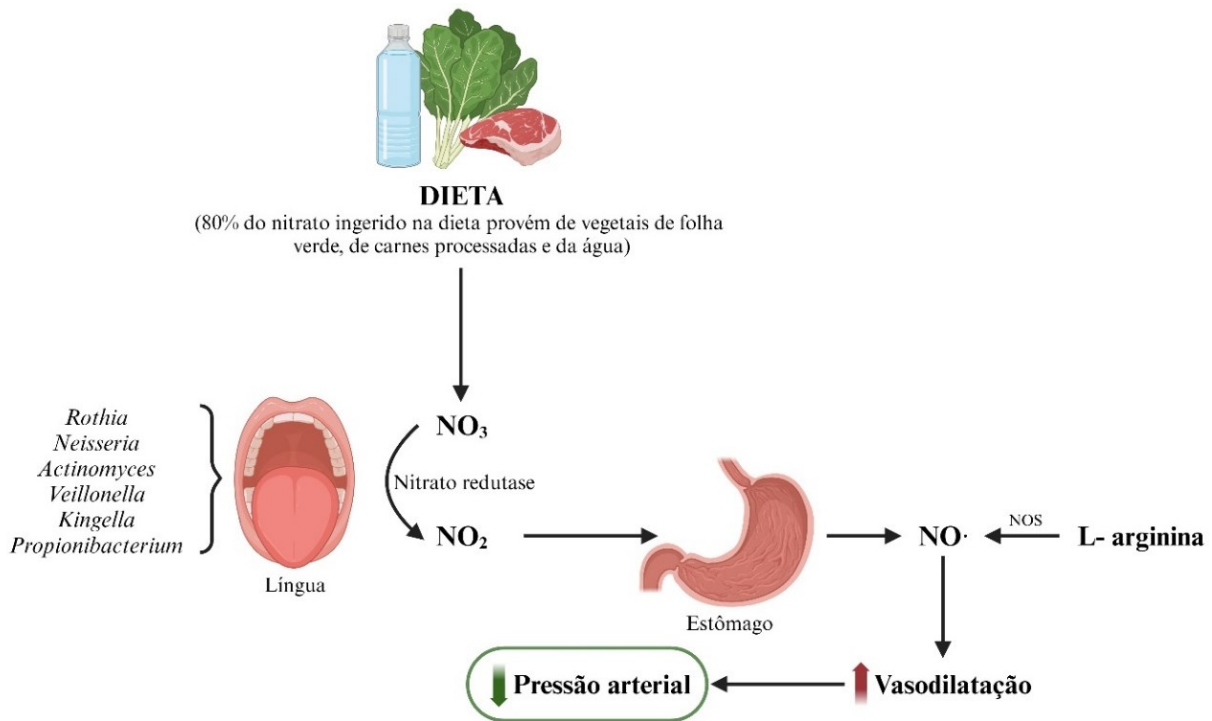


Figura 8 - Correlação entre o nitrato ingerido na dieta, as bactérias comensais orais e a regulação da pressão arterial (Adaptado de Pignatelli et al., 2020).

O efeito hipotensor desta dieta foi atribuído ao seu elevado teor de cálcio, potássio, polifenóis e fibras e ao baixo teor de sódio e de proteínas animais. Como

referido acima, o conteúdo em nitrato inorgânico em certos legumes e frutas pode funcionar como um substrato fisiológico para a redução a nitrito, óxido nítrico e outros metabolitos (NO_x) que produzem efeitos vasodilatadores, contribuindo assim para a diminuição da pressão arterial e para a melhoria da função cardiovascular (Hord et al., 2009).

3.4 DOENÇA PERIODONTAL E O ÓXIDO NÍTRICO

Como referido anteriormente, a expressão da enzima iNOS ocorre em resposta a estímulos inflamatórios como a IL-1, o TNF e o LPS e produz grandes quantidades de óxido nítrico, que pode estar associado tanto a efeitos nocivos como benéficos nos tecidos (Batista et al., 2002). Dada a associação destas citocinas no desenvolvimento da doença periodontal, colocou-se também a hipótese de o $\text{NO}\cdot$ poder estar envolvido na progressão desta patologia (Wang et al., 2019).

O $\text{NO}\cdot$ presente nos tecidos periodontais e na saliva pode fazer parte dos mecanismos de defesa naturais não específicos do hospedeiro contra bactérias patogénicas, no entanto, em alternativa, quando produzido em quantidades excessivas, o NO pode atuar como uma molécula citotóxica, levando potencialmente à destruição dos tecidos (Batista et al., 2002; Uğar-Çankal & Ozmeric, 2006).

Alguns estudos descritos na literatura relataram níveis mais elevados de L-arginina, L-citrulina e arginase em pacientes periodontalmente comprometidos (Batista et al., 2002; Uğar-Çankal & Ozmeric, 2006). Uma vez que o $\text{NO}\cdot$ é sintetizado a partir da conversão da L-arginina em L-citrulina pela NOS, a arginase, uma enzima redutora de arginina, pode competir com a NOS pelo substrato comum, a L-arginina, inibindo assim a produção de $\text{NO}\cdot$. Por conseguinte, o aumento da atividade da arginase salivar na periodontite, pode levar a uma diminuição das propriedades antibacterianas da saliva e pode tornar o tecido periodontal mais suscetível aos agentes patogénicos existentes. Portanto, a atividade da arginase na periodontite, juntamente com a via da arginina-óxido nítrico, pode justificar concentrações de nitrito salivar mais baixas em indivíduos com esta patologia (Uğar-Çankal & Ozmeric, 2006).

Por outro lado, é também plausível que possa haver um aumento da concentração salivar de nitrato e nitrito em pacientes com doença periodontal devido a

um aumento da secreção de nitrato como resposta das glândulas salivares ao processo inflamatório, podendo-se eventualmente considerar o NO_2^- como um biomarcador desta patologia (Qu et al., 2016).

Assim sendo, a medição dos níveis de nitritos e de nitratos pode ser muito útil para compreender a etiopatogénese da doença periodontal, pelo que é pertinente desenvolver uma ferramenta eficaz e adequada para a deteção de nitritos e nitratos na saliva, o que poderá levar a uma melhor compreensão do papel destes compostos na etiopatogénese, evolução e tratamento da DP (Reher et al., 2007; Sukuroglu et al., 2015).

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO E NITRATO

3.5.1. MÉTODO TRADICIONAL

A deteção e quantificação do óxido nítrico e das espécies reativas de azoto relacionadas *in vivo* é essencial para compreender diversas patologias e otimizar os tratamentos possíveis para as mesmas. Para o efeito, ao longo dos anos foram desenvolvidos vários métodos de deteção e quantificação para estudar o NO mas, devido ao seu tempo de vida de apenas alguns segundos, a sua formação endógena é avaliada indiretamente através da quantificação dos seus metabolitos estáveis, o nitrato e o nitrito. De entre os métodos disponíveis para este efeito podemos destacar a cromatografia iónica, a eletroforese capilar, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, a quimiluminescência e técnicas eletroquímicas (Almeida et al., 2010; Bellavia et al., 2015; Li et al., 2018).

No caso da quantificação de NO_3^- , esta é geralmente determinada pela redução prévia dos nitratos a nitritos, quer por processos enzimáticos (por exemplo, por meio da redutase do nitrato) quer por processos inorgânicos (por exemplo, com recurso a colunas de cobre ou cádmio). De seguida, realiza-se a subtração da quantidade total de NO_2^- da concentração de nitritos registada em amostras não reduzidas (Almeida et al., 2010).

Desta panóplia de opções, os métodos espectrofotométricos baseados na reação de Griess têm sido a base da análise de NO_2^- durante várias décadas, oferecendo as

vantagens da simplicidade, eficiência e baixo custo (Tsikas, 2007; Bhakta et al., 2014; Li et al., 2018).

Na reação de Griess, descrita pela primeira vez por Johann Peter Griess em 1879, o nitrito reage em condições ácidas com o ácido sulfanílico ($\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{NH}_2$) para formar um catião diazônio ($\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{-N N}^+$) que se liga posteriormente à amina aromática L-naftilamina ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NH}_2$) para produzir um corante azo, solúvel em água, de cor vermelho-violeta ($\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{-N N-C}_{10}\text{H}_6\text{NH}_2$), pelo que podemos inferir que este é um método colorimétrico e conseqüentemente pode estar suscetível à interferência de pigmentos coloridos que podem estar presentes na solução (Li et al., 2018; Tsikas, 2007). Esta reação é também específica para o nitrito, pelo que a análise do nitrato por esta via requer a redução química ou enzimática do nitrato a nitrito antes da reação de diazotação (Tsikas, 2007).

Embora amplamente utilizado, depreendemos que este método tem diversas limitações, tais como a necessidade de utilização de um espectrofotómetro juntamente com grandes volumes de reagentes e de amostras uma vez que não é suficientemente sensível para detetar NO_2^- em concentrações muito baixas, procedimentos de preparação de amostras complexos, tempos de análise longos e custos elevados, pelo que não são facilmente aplicáveis em rastreios em grandes escalas (Almeida et al., 2010; Bhakta et al., 2014; Li et al., 2018).

Devido a estas desvantagens, tornou-se altamente desejável o desenvolvimento de novos métodos para a deteção de NO_2^- que oferecessem uma monitorização simples, rápida, com elevada sensibilidade e seletividade, de baixo custo e que pudesse ser realizada no local da recolha da amostra (Li et al., 2018; Monteiro et al., 2019).

3.5.2 BIOSSENSORES

Neste contexto, os biossensores eletroquímicos baseados em enzimas redutase altamente ativas e estáveis, são apresentados como uma alternativa promissora aos métodos apresentados anteriormente devido ao seu tempo de resposta rápido, elevada seletividade e sensibilidade (Almeida et al., 2010; Monteiro et al., 2019).

Um biossensor consiste na conjugação de um elemento biológico capaz de reconhecer a substância a analisar em amostras complexas e de um transdutor físico-químico que traduza o evento de bio reconhecimento num sinal eletrónico proporcional à concentração da substância a analisar (Monteiro & Almeida, 2019).

Para além de fornecerem a resposta seletiva e sensível necessária, estes dispositivos devem ainda ser fáceis e baratos de fabricar em dimensões reduzidas, transformando um protocolo laboratorial longo e elaborado numa tarefa simples que pode ser executada rapidamente. Além disso, como ferramenta sem reagentes, estes dispositivos podem ser considerados ferramentas analíticas sustentáveis (Almeida et al., 2010; Li et al., 2018).

No entanto, estes apresentam algumas desvantagens uma vez que os biossensores de utilização única, tal como aqueles utilizados na presente investigação, não são capazes de monitorizar a concentração do analito ao longo do tempo. Por conseguinte, todos os dispositivos descartáveis e não regenerativos necessitam de um ecrã digital associado. Neste projeto em particular, recorreremos à utilização de um eléctrodo impresso (SPE) modificado por enzimas, o qual é acoplado a um potencióstato portátil. Uma vez que os biossensores descartáveis são fabricados utilizando a tecnologia de produção em massa e são calibrados previamente, a reprodutibilidade dentro dos lotes assume extrema importância (Monteiro & Almeida, 2019).

4. HIPERTENSÃO ARTERIAL

4.1 ETIOLOGIA

As doenças cardiovasculares (DCV) continuam a ser, em Portugal, a principal causa de morte, tendo provocado 32586 óbitos durante o ano de 2019, sendo 2361 destes fruto de hipertensão arterial, segundo os dados da OMS (*WHO Mortality Database*).

Segundo os dados estatísticos de 2017 publicados na *European Heart Network*, as DCV são responsáveis por 45% de todas as mortes na Europa e 37% de todas as mortes na União Europeia (DGS Norma 020/2011, atualizada a 19/03/2013).

A HTA é considerada o principal fator potenciador de DCV e pode-se manifestar devido a um aumento do débito cardíaco, a um aumento da resistência vascular periférica ou a uma combinação de ambos (Jordan et al., 2018).

No entanto, com o decorrer do envelhecimento, a causa predominante da HTA tende a ser o aumento da resistência vascular periférica, frequentemente associada a um aumento da rigidez vascular, que se manifesta clinicamente como hipertensão sistólica isolada (Wallace et al., 2007).

4.2 FATORES DE RISCO

Existem alguns fatores de risco que aumentam a probabilidade de um indivíduo vir a manifestar HTA ao longo da sua vida (Jordan et al., 2018). Neles incluem-se fatores não modificáveis como a predisposição genética, o sexo e a idade (os homens têm maior risco de desenvolver esta doença após os 55 anos e as mulheres após a menopausa) (Jordan et al., 2018).

Interagindo com estes fatores temos também alguns fatores modificáveis, como é o caso de uma alimentação inadequada e um consumo excessivo de sal, a obesidade, sedentarismo e o consumo de tabaco, que quando aliados aos fatores descritos anteriormente potenciam fortemente o desenvolvimento desta patologia (Jordan et al., 2018).

4.3 CLASSIFICAÇÃO

A HTA é o fator de risco mais prevalente na população portuguesa para o posterior desenvolvimento de DCV e, por consequência, apesar de ser simples o seu diagnóstico, este deve obedecer a um processo criterioso e rigoroso de avaliação, diagnóstico e classificação (DGS Norma 020/2011, atualizada a 19/03/2013).

O seu diagnóstico define-se, em avaliação clínica, como a elevação persistente, em várias medições e em diferentes ocasiões, da pressão arterial sistólica (PAS) igual ou superior a 140 mmHg e/ou da pressão arterial diastólica (PAD) igual ou superior a 90 mmHg (DGS Norma 020/2011, atualizada a 19/03/2013).

A hipertensão arterial pode ser classificada em três graus, correspondendo o grau 1 a hipertensão arterial ligeira, o grau 2 a hipertensão arterial moderada e o grau 3 a hipertensão arterial grave. Os profissionais de saúde registam nos processos clínicos os valores de pressão arterial (PA) avaliados em cada situação clínica e classificam-na consoante os limites de referência da pressão arterial apresentados na tabela 3 (DGS Norma 020/2011, atualizada a 19/03/2013).

Tabela 3 - Limites de referência da pressão arterial para o diagnóstico de hipertensão arterial.

Pressão arterial em adultos (mmHg)	PAS <120 e PAD <80	Ótima
	PAS 120-129 e/ou PAD 80-84	Normal
	PAS 130-139 e/ou PAD 85-89	Normal Alta
	PAS 140-159 e/ou PAD 90-99	HTA Grau I
	PAS 160-179 e/ou PAD 100-109	HTA Grau II
	PAS \geq 180 e/ou PAD \geq 110	HTA Grau III
	PAS \geq 140 e/ou PAD <90	Hipertensão Sistólica Isolada

Para efeitos de classificação, quando as PAS e PAD estiverem em diferentes categorias, considerar-se-á a categoria do valor mais elevado (DGS Norma 020/2011, atualizada a 19/03/2013).

Esta definição de HTA é válida para pessoas de idade igual ou superior a 18 anos, que não estejam sujeitas a tratamento farmacológico anti hipertensor e que não apresentem patologia aguda concomitante ou se encontrem grávidas (DGS Norma 020/2011, atualizada a 19/03/2013).

5. CORRELAÇÃO ENTRE DP, HTA E NÍVEIS MÉDIOS DE NITRITO

A literatura recente tem mostrado que existe uma correlação bem estabelecida entre a saúde oral e algumas doenças sistêmicas, havendo evidências que associam as bactérias presentes em situações de doença periodontal e a perda de dentes a doenças cardiovasculares, como a HTA (Pignatelli et al., 2020; Del Pinto et al., 2020)

A patogênese da hipertensão arterial em quadros de periodontite é complexa e envolve principalmente o comprometimento das propriedades vasodilatadoras do endotélio (Surma et al., 2021). Isto pode dever-se ao facto de a DP estar na origem de um processo inflamatório sistémico mediado por citocinas como o fator de necrose tumoral e interleucinas (IL), entre outros e de estes fatores poderem ter um efeito direto no endotélio vascular, prejudicando a sua função vasodilatadora. Outra possibilidade é que a inflamação periodontal aumente a atividade quimiotática dos linfócitos T e B, conduzindo à desregulação vascular e ao consequente aumento da pressão arterial (Surma et al., 2021).

Outro fator a ter em consideração é a disbiose da microbiota oral que se verifica em pacientes com DP, uma vez que algumas bactérias comensais orais, por meio da redução do nitrato a nitrito, podem fornecer $\text{NO}\cdot$ bioativo, que é essencial para a função das células endoteliais e para a regulação da pressão arterial. Por conseguinte, pensa-se que uma quantidade reduzida de bactérias orais redutoras de nitratos e uma quantidade aumentada de bactérias patogénicas são responsáveis por uma correlação entre a higiene oral e a periodontite e, numa fase posterior, a doença cardiovascular (Pignatelli et al., 2020; Surma et al., 2021).

Podemos então concluir que a periodontite pode ser considerada um fator de risco modificável para a hipertensão arterial. Por conseguinte, manter uma boa higiene oral deve ser um método de prevenção da hipertensão arterial e um método para melhorar a eficácia do tratamento anti-hipertensivo. Na manutenção da higiene oral, devem ser evitados os colutórios com clorhexidina em excesso, uma vez que essa utilização interfere com a homeostasia do óxido nítrico e aumenta o risco de hipertensão arterial (Surma et al., 2021).

II. OBJETIVOS

Objetivo 1: Comparar os níveis de concentração de nitrito na saliva em pacientes com doença periodontal e pacientes periodontalmente saudáveis, utilizando biossensores inovadores desenvolvidos *in house*.

Objetivo 2: Avaliar eventuais correlações entre a concentração de nitritos na saliva, a severidade da doença periodontal e o os valores de pressão arterial.

Objetivo 3: Implementar um protocolo de quantificação de nitratos em amostras de saliva, recorrendo ao dispositivo NO2Probe.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. ESTUDO CLÍNICO

1.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Foi obtido o parecer favorável por parte da Comissão de Ética da Egas Moniz para a realização deste projeto de investigação, a dia 2 de março de 2023 (ID:1140/2022) (anexo 1).

O estudo foi realizado de acordo com os princípios da Declaração de Helsinquia de 1975, revista em 2013.

Os participantes assinaram previamente um consentimento informado no qual eram explicados os objetivos do projeto. Os dados recolhidos foram mantidos em anonimato e foram unicamente utilizados para análise estatística, de modo a proteger os interesses dos participantes.

1.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

1.2.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Idade igual ou superior a 40 anos;
- Pacientes com pelo menos 6 dentes presentes;
- Pacientes que tenham assinado o consentimento informado.

1.2.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes medicados com fármacos à base de nitritos ou com geradores de óxido nítrico;
- Pacientes que tenham tomado antibióticos há 15 dias ou menos;
- Pacientes que tenham bochechado com colutório de clorexidina no início da consulta;
- Pacientes que tenham realizado alisamentos radiculares ou outro tipo de tratamento periodontal;
- Mulheres grávidas;
- Pacientes que não sejam fluentes em língua portuguesa.

Na figura 9 podemos observar, de forma esquematizada, todos os processos que irão ser descritos, no respetivo encadeamento.

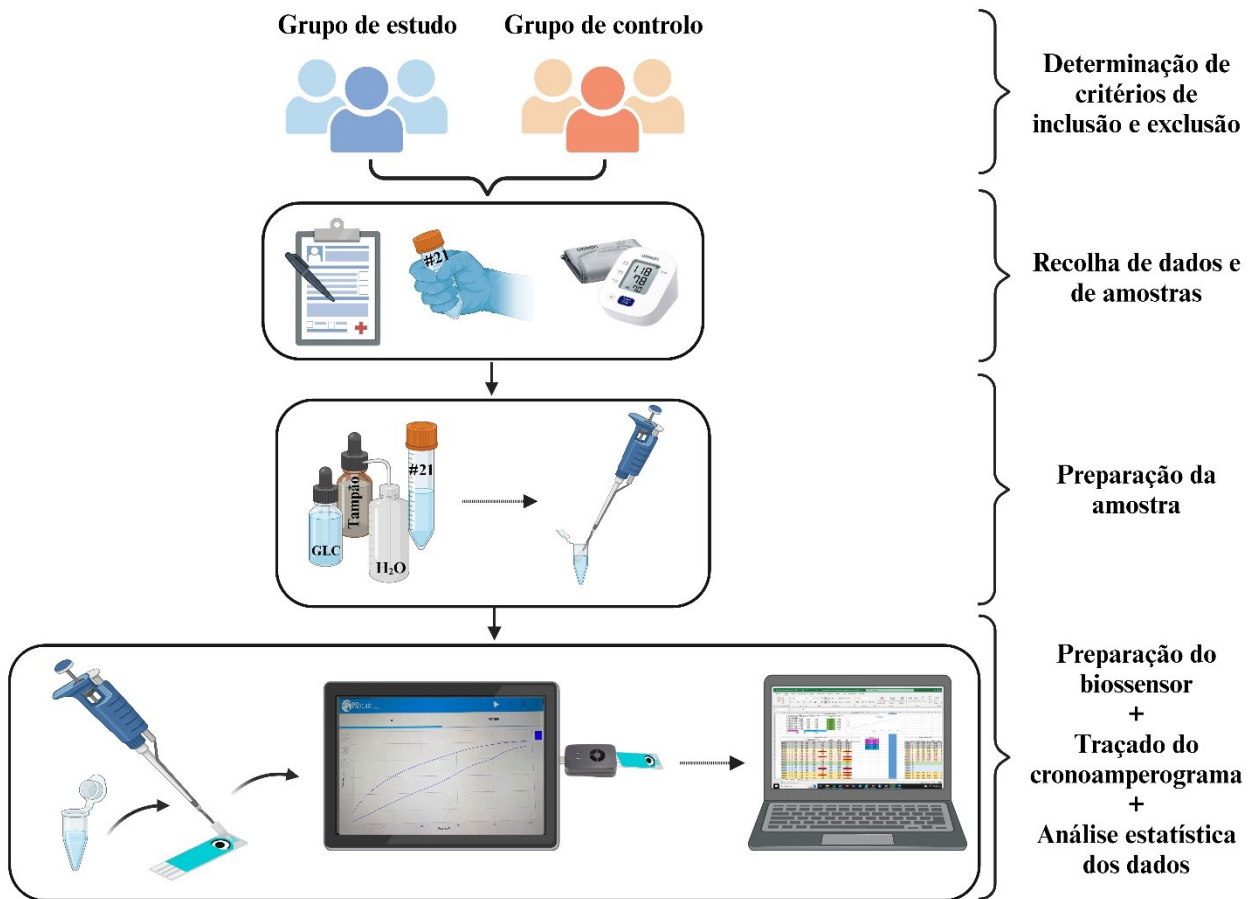


Figura 9 - Esquematização do processo experimental.

1.3. RECOLHA DE DADOS

No início da consulta foi apresentado a todos os pacientes que cumpriam os critérios de inclusão um consentimento informado (anexo 2) e um questionário sociodemográfico, clínico e alimentar (anexo 3), de forma a poder ser feito o levantamento de dados tais como: idade, sexo, peso, altura, patologias sistémicas, medicação, hábitos de higiene e alimentação e hábitos tabágicos. Foi ainda medida a tensão arterial de cada paciente utilizando um medidor de tensão arterial de braço M2 da marca Omron, no início da consulta.

Posteriormente, foram consultados os processos clínicos de cada participante de forma a obter dados adicionais não contemplados no questionário (história clínica, periodontogramas, registos radiográficos). Todos os diagnósticos periodontais foram confirmados e os pacientes do grupo de controlo encontravam-se todos periodontalmente saudáveis.

1.4. RECOLHA DAS AMOSTRAS

Foram recolhidos aproximadamente 2mL de saliva não estimulada de cada participante no início da consulta.

Primeiramente, os pacientes foram submetidos a um gargarejo com água para limpar a boca e auxiliar a salivação. Após o gargarejo, o indivíduo salivava de forma não estimulada, colocando a cabeça inclinada para a frente, colocando o fluido salivar num tubo Falcon estéril e previamente identificado. Os Falcons foram imediatamente fechados e colocados no gelo, por um período não superior a 20 minutos.

As amostras de saliva foram analisadas imediatamente para eliminar a variável tempo.

2. QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO E NITRATO

2.1. PREPARAÇÃO DO BIOSSENSOR NO₂PROBE

Os elétrodos impressos apresentados na figura 10 são compostos por um eletrodo de trabalho (WE) de carbono, um contra eletrodo (CE) de carbono e um eletrodo de pseudoreferência de prata (Ag). Estes foram modificados através da imobilização de enzimas na superfície do WE de carbono, de acordo com o seguinte protocolo.

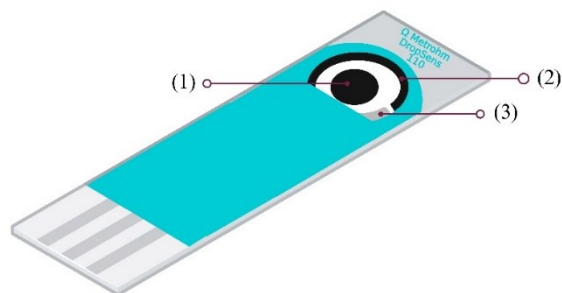


Figura 10 - Sistema de três eletrodos impresso, composto por um (1) eletrodo de trabalho de carbono, um (2) contra eletrodo de carbono e um (3) pseudo-eletrodo de referência de Ag.

Uma gota de 5 μL de redutase do nitrito do citocromo c ($cc\text{NiR}$) (1 mg mL^{-1}) foi utilizada segundo o método “drop-cast” e seca em estufa, durante 30 minutos ($37 \text{ }^\circ\text{C}$). Esta camada foi revestida com uma gota de 5 μL de uma mistura de glucose oxidase (GOx) e catalase (Cat) e seca a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min. Finalmente, foram adicionados 10 μL de solução de 1.25% álcool polivinílico (PVA) para cobrir as enzimas e aumentar o k_m^{app} da $cc\text{NiR}$. O revestimento de PVA foi seco na estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos. A figura 11 apresenta um esquema das tiras de teste resultantes.

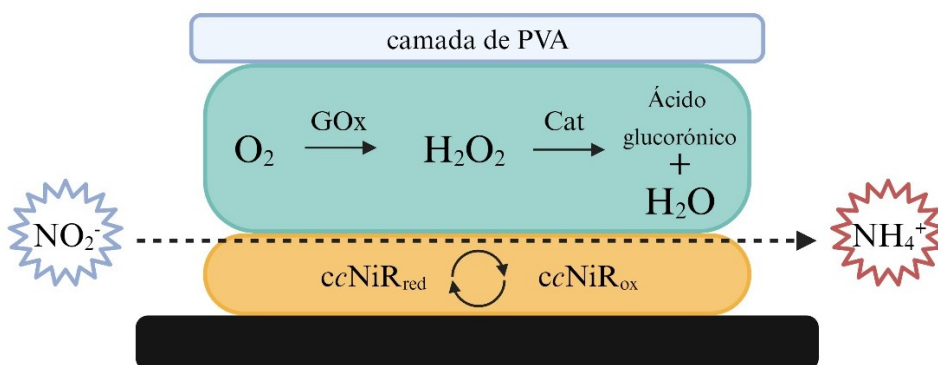


Figura 11 - Esquema pormenorizado de um $cc\text{NiR}/\text{GOx}/\text{Cat}/\text{PVA}/\text{SPE}$. O eletrodo de trabalho (camada preta) é modificado através da deposição de duas camadas de enzimas diferentes. A primeira camada é composta por $cc\text{NiR}$ que converte o NO_2^- em NH_4^+ . A camada seguinte é constituída pelo sistema absorvente de oxigênio GOx/Cat , que catalisa a reação de redução do O_2 em água (Adaptado de Monteiro et al., 2019).

Os biossensores foram utilizados imediatamente após a conclusão da preparação ou armazenados a 4°C , em placas de Petri devidamente seladas.

O sistema de três elétrodos foi coberto com uma gota de 50 μL de uma solução preparada com glucose 100 mM, e 0.1 M Tris-HCl em 0.1 M KCl pH 7.6 misturado com a amostra de saliva ou solução padrão. Após a utilização, os biossensores foram descartados.

Para a quantificação de nitrato, procedeu-se à preparação de uma solução de 400 μL de tampão fosfato potássico 0.14 M KH_2PO_4 pH 7.4, 325 μL de água desionizada, 250 μL de saliva e 8 μL de NADPH. Após 2 minutos, foram adicionados 17 μL de enzima redutase do nitrato (NR) e, após 8 minutos, foram repetidos os passos referidos no parágrafo anterior.

Os ensaios em branco foram efetuados com uma gota de glucose 100 mM e 0.1 M Tris-HCl em 0.1 M KCl pH 7.6. As medições eletroquímicas foram efetuadas seguindo a técnica da cronoamperometria e foram repetidas todas as semanas em que eram recolhidas amostras (anexo 4).

Os cronoamperogramas foram traçados utilizando um potencial fixo de -0,5 V (vs pseudoreferência Ag) e a variação da corrente catalítica foi medido após 60 s. Os biossensores foram calibrados em dois momentos utilizando padrões de nitritos de 10, 20, 40, 80, 160, 200, 250 e 300 μM (um bioelétrodo e respetivo duplicado por concentração). A corrente catalítica foi representada num gráfico em função da concentração de nitritos e o gráfico foi ajustado a uma curva linear utilizando o modelo de regressão linear (anexo 5), delineando assim uma curva de calibração. A todos os valores de corrente foi subtraído o correspondente valor de branco (corrente registada na ausência de nitrito).

Para cada participante, foram realizadas duas medições da mesma amostra usando dois biossensores separados e, posteriormente, foi feita a média dos valores de corrente catalítica.

2.2. MÉTODO DE GRIESS

O método de Griess é o protocolo clássico para quantificar nitritos em diferentes amostras. Para efetuar a curva de calibração, foram preparadas 10 concentrações padrão (2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 22,5 e 25 μM), incluindo um branco, partindo de uma

solução stock de 10 mM de nitritos em hidróxido de sódio a 0,02%. As soluções mãe dos reagentes de Griess foram preparadas nas seguintes concentrações, 1% m/v SA e 0,02% m/v Dihidrocloreto de N-(1-naftil) etileno diamina (NED) e armazenadas num frasco escuro durante 1 mês. Todos os meses foi preparada uma nova curva de calibração com as soluções-mãe novas e frescas de nitritos, SA e NED.

Para traçar a curva de calibração, adicionaram-se numa cuvete de plástico 25 μ L de padrão, 475 μ L de água desionizada, 250 μ L de SA e 250 μ L de NED, por esta ordem. Após 10 minutos, a absorvância foi medida a 540 nm. Para a análise da amostra de nitrito, foi utilizado o mesmo protocolo, substituindo a solução padrão por igual volume de amostra. Para a quantificação de nitrato segundo este método, foi aplicado o mesmo protocolo descrito para a utilização do biossensor, tendo sido utilizada a amostra após incubação com NR.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram registados no Microsoft Office Excel® e analisados com recurso ao software IBM® SPSS® Statistic 27.0. Foram aplicadas metodologias de análise estatística descritiva e inferencial. Foi estabelecido um nível de significância de 5% para todas as análises inferenciais.

4. MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS

4.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Para a quantificação de nitrito pelo método de Griess foram utilizados os seguintes reagentes: nitrito de sódio ($\geq 99\%$) adquirido à Normapur® e hidróxido de sódio 0.02% ($\geq 98\%$), sulfanilamida ($\geq 98\%$), ácido clorídrico 37% e NED ($\geq 98\%$) (Sigma-Aldrich®).

Para preparar os biossensores e posteriormente quantificar nitrito, foram utilizados diversos reagentes, tais como: glucose ($\geq 99.5\%$) (Sigma-Aldrich®) preparada com tampão 0,1M Tris-HCL, 0.1 M KCl, pH 7.6 (composto por ácido clorídrico 37% e Trizma (Sigma-Aldrich®) e cloreto de potássio (Fluka ®). As enzimas

GOx de *Aspergillus niger* 10kU e Cat de fígado de bovino 2000-5000 unidades/mg de proteína (Sigma-Aldrich®).

As soluções de enzimas mencionadas anteriormente (glucose oxidase e catalase) foram preparadas em tampão fosfato salino (contendo cloreto de sódio e cloreto de potássio (Fluka®) e fosfato de sódio monobásico e fosfato de potássio dibásico trihidratado ($\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich®).

A enzima ccNiR (300 U mg⁻¹) foi obtido por meio das células do organismo *Desulfovibrio desulfuricans* e purificada como descrito por Almeida et. al. (2003).

O PVA previamente preparado em laboratório foi obtido na Sigma-Aldrich®.

Para a quantificação de nitrato, foram adquiridos NADPH da Panreac® e enzima redutase do nitrato de *Aspergillus species* 20U adquirida na Merck®. Para a preparação do tampão fosfato potássico 0.14 M KH₂PO₄ ph 7.5 foram adquiridos dihidrógeno fosfato de potássio, adquirido na Supelco®, fosfato de potássio dibásico trihidratado ($\geq 99.0\%$) da Sigma-Aldrich®.

Todas as soluções referidas anteriormente foram preparadas utilizando água desionizada (18 MΩ cm) a partir do sistema de purificação MilliQ.

4.2. EQUIPAMENTOS

Todos os reagentes sólidos foram pesados numa balança digital Ohau® Pioneer Px. O pH das soluções foi medido recorrendo ao medidor BANTE Instruments® 210 Benchtop.

Os elétrodos de carbono impressos DS-110 foram obtidos na DropSens®.

A secagem dos biossensores foi efetuada numa estufa IKA® KS 4000 i control e para posterior armazenamento e transporte, foram utilizadas placas de Petri devidamente acondicionadas.

Para as medições eletroquímicas, foi utilizado um potencióstato portátil *SensitSmart*® da PalmSens® e para a aquisição de dados recorreu-se à utilização do

software PStouch. As medições espectrofotométricas foram efetuadas com um aparelho portátil THORLabs®.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ANÁLISE DEMOGRÁFICA DA AMOSTRA

Este projeto teve como amostra inicial um grupo composto por 45 indivíduos (N=45) que cumpriam cumulativamente todos os critérios de inclusão referidos anteriormente e aos quais foi aplicado o consentimento e questionário apresentados em anexo, medido o valor de tensão arterial e recolhida uma amostra de saliva não estimulada.

A amostra foi posteriormente dividida em grupo de estudo (GE), composto por indivíduos com doença periodontal e grupo de controlo (GC), composto por indivíduos sem comprometimento a nível periodontal. A distribuição da amostra por ambos os grupos e de acordo com o género e a faixa etária encontra-se representada nas tabelas 4 e 5, respetivamente.

Tabela 4 - Distribuição da amostra de acordo com o género.

GÉNERO	GE	GC	TOTAL
MASCULINO	15	13	28
FEMININO	9	8	17
Total	24	21	45

Tabela 5 - Distribuição da amostra de acordo com a faixa etária.

FAIXA ETÁRIA	GE	GC	TOTAL
40-49	8	14	22
50-59	4	3	7
60-69	4	3	7
70-79	5	1	6
80-89	3	-	3
MÉDIA	60,8	48,2	54,9

2. VALORES DE NITRITO E A DOENÇA PERIODONTAL

Como foi referido anteriormente na secção III.2.1, previamente à recolha de amostras foi traçada uma reta de calibração com valores de concentração de NO_2^- conhecidas, de forma a poder ser feita a interpolação das concentrações das várias amostras. A título de curiosidade, no anexo 5 são apresentadas as duas retas de calibração utilizadas ao longo do projeto, enquanto que na tabela 6 podemos observar os seus valores de concentração de NO_2^- (10 a 300 μM) assim como as respetivas correntes catalíticas.

Tabela 6 - Média de corrente de dois ensaios para valores padronizados de NO_2^- .

[NO₂-] (μM)	MÉDIA DE CORRENTES (μA) 08/05/2023	MÉDIA DE CORRENTES (μA) 17/07/2023
10	0,138	0,163
20	0,416	0,404
40	0,730	0,704
80	1,320	1,394
100	1,708	1,744
160	2,252	2,255
200	2,727	2,741
250	3,131	3,305
300	3,988	3,979

Com base nestes valores, foram consideradas todas as concentrações de NO_2^- que se encontrassem compreendidas entre os valores $10 \leq x \leq 300 \mu\text{M}$. Posteriormente, e uma vez que se observou uma disparidade de resultados de correntes entre duplicados, optou-se ainda por incluir um critério de exclusão adicional, que eliminou todas as amostras cuja diferença de correntes fosse superior a 0,25 μA .

Desta forma, verificando a lista completa dos participantes inicialmente envolvidos no estudo (N=45), apenas 34 destas amostras demonstraram valores de nitrito válidos de ser utilizados, segundo os critérios referidos anteriormente e esquematizados no fluxograma da figura 12.

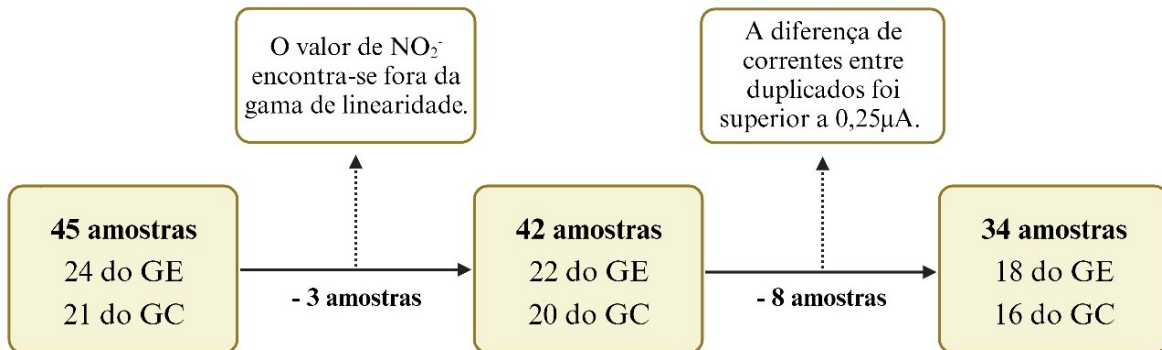


Figura 12 - Critérios de exclusão de amostras.

Refira-se que dentro do GE optou-se por não se fazer subdivisões tendo em consideração o estadio e o grupo da doença periodontal, devido ao tamanho reduzido da amostra.

O primeiro parâmetro a ser avaliado foi a concentração de nitrito em função do grupo. Como demonstrado na figura 13, os valores médios de nitrito registados ($196 \pm 226 \mu\text{M}$) no grupo de controlo foram inferiores àqueles registados no grupo de estudo ($230 \pm 204 \mu\text{M}$). Contudo, ambos os grupos apresentaram uma grande amplitude de resultados, entre $10,26 \mu\text{M}$ e $770,04 \mu\text{M}$ e entre $11,68 \mu\text{M}$ e $597,36 \mu\text{M}$ respetivamente.

Desta forma, devido à grande discrepância de resultados dentro de cada grupo, e ao conseqüente desvio padrão associado, estas diferenças não podem ser consideradas estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

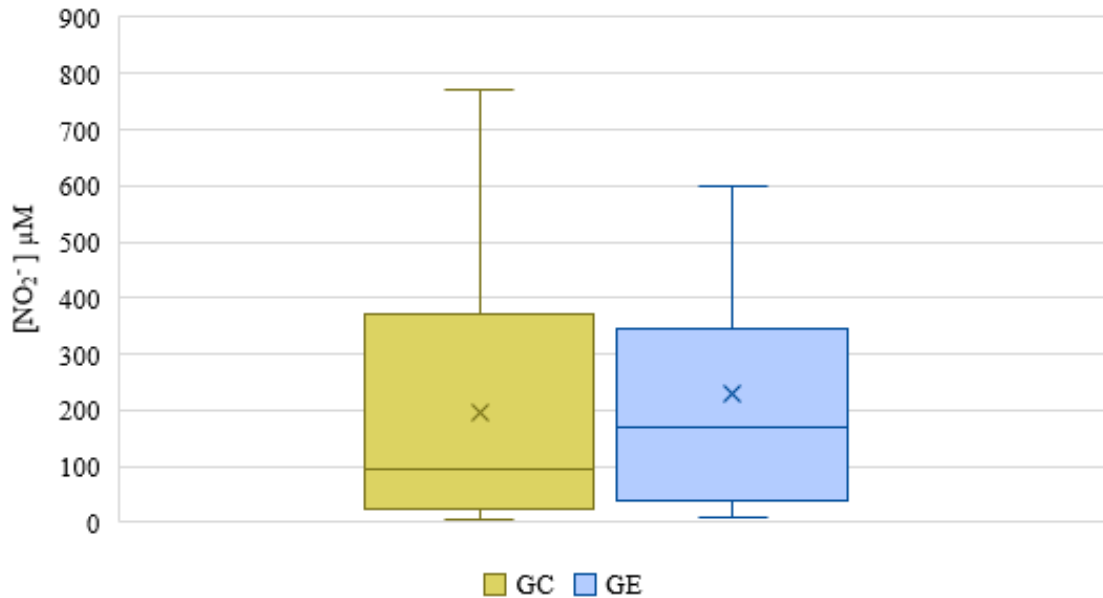


Figura 13 - Valores de NO_2^- para o grupo de estudo e para o grupo de controlo.

Não obstante, a diferença entre os resultados médios obtidos vai de encontro ao que é considerado em grande parte da literatura, uma vez que é possível que o ambiente pró-inflamatório instalado em indivíduos com doença periodontal, dê origem a estímulos capazes de induzir a produção de $\text{NO}\cdot$ pelas enzimas iNOS. Isto iria então potenciar o aumento da concentração salivar de nitrito devido a um aumento da secreção de nitrato como resposta das glândulas salivares ao processo inflamatório desencadeado (Sánchez et al., 2014).

No entanto, não se podem excluir outros motivos para os níveis elevados de nitritos em pacientes periodontais, uma vez que já foi postulado que, em determinadas condições, esta concentração pode estar aumentada devido a uma maior presença de bactérias redutoras de nitratos (Sánchez et al., 2014). Desta forma, o nitrito derivado da redução enzimática microbiana do nitrato alimentar, independente do oxigénio e da NOS, foi identificado como uma importante fonte secundária de $\text{NO}\cdot$ e de outros óxidos de azoto, pelo que no futuro seria relevante analisar o microbioma oral de cada paciente de forma a identificar o contributo da mesma nas concentrações salivares deste ião (Koch et al., 2017).

De um outro prisma, sabe-se que os nitratos fonte da dieta estão concentrados nas glândulas salivares e são segregados para a cavidade oral, pelo que a ingestão de alimentos ricos nestes compostos irá aumentar significativamente os seus níveis

salivares (Lundberg & Govoni, 2004; Qin et al., 2012). De forma a contemplar esta questão, foi aplicado um questionário alimentar a cada paciente. No entanto, ao longo do estudo foram detetadas diversas lacunas na compreensão e aplicação do mesmo e de forma a minimizar o risco de viés, optou-se por não se ter em conta as respostas obtidas.

É de salientar que a vasta gama de resultados obtidos em ambos os grupos foi um resultado surpreendente, tendo sido admitido que uma má manipulação das amostras de saliva devido à sua viscosidade, inexperiência por parte do operador ou interferências na própria amostra pudessem estar na origem do problema. Desta forma, e de forma a identificar possíveis interferências de fatores não considerados previamente e que pudessem ser intrínsecos a cada indivíduo, foi desenhado um pequeno estudo de carácter preliminar, que visava comparar os valores de branco obtidos quando o biossensor era preparado com recurso a uma amostra de saliva do próprio paciente com o branco obtido com a solução tampão sem nitrito, tal como exemplificada na secção III.2.1. deste trabalho. Para este efeito, foram preparados quatro eléctrodos impressos sem ccNiR, e foram traçados os cronoamperogramas das amostras #42 e #43 (ambos indivíduos do GC) e respetivos duplicados. Foi também calculada a média de todos os valores de branco utilizados ao longo deste projeto, apresentados no anexo 4. Os valores obtidos encontram-se apresentados na tabela 7.

Tabela 7 – Intensidade de corrente dos brancos obtidos com amostras de saliva e com solução tampão.

AMOSTRA DE SALIVA		SOLUÇÃO TAMPÃO
Amostra	Valor Médio de Corrente (μA) (N=2)	Valor Médio de Corrente (μA) (N=9)
#42	0,17 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01
#43	0,19 \pm 0,06	

Ao analisarmos os resultados obtidos foi possível concluir que, doravante é necessário produzir brancos individualizados pois os valores de branco de cada indivíduo são afetados pelo fator matriz saliva, pelo que podem ser inferiores ao branco

padronizado considerado, o que pode posteriormente induzir erros no cálculo das concentrações de NO_2^- .

3. VALORES DE NITRITO E HTA

Na tabela 8 podemos observar a distribuição dos 34 participantes consoante o seu grau de HTA, estando também descrita a concentração média de nitritos analisada em cada grupo, bem como o desvio padrão associado.

Após análise dos resultados não foi possível estabelecer uma correlação entre os níveis médios de nitrito e os diferentes graus de HTA ($p > 0,05$). Este resultado pode ser derivado de algumas limitações deste projeto, tal como a presença de heterogeneidade da amostra e o facto de apenas ter sido feita uma medição de tensão arterial por paciente, contrariamente ao que é preconizado pela Norma 020/2011, atualizada a 19/03/2013 da Direção Geral de Saúde (DGS).

Tabela 8 - Concentrações de nitrito em função do grau de HTA.

GRAU DE HTA	N	$[\text{NO}_2^-]$ μM
Ótima	7	143 \pm 207
Normal	8	290 \pm 216
Normal Alta	13	234 \pm 248
HTA Grau I	4	91,11 \pm 66,80
HTA Grau II	2	281 \pm 50

Evidências recentes da literatura demonstram que as bactérias presentes na cavidade oral estão envolvidas na via nitrato-nitrito-óxido nítrico e na patogénese da hipertensão arterial, havendo concentrações elevadas de bactérias redutoras de nitrito a aumentar o $\text{NO}\cdot$ sistémico e a ter um efeito redutor na pressão arterial sistólica (Vanhatalo et al., 2018; Aguilera et al., 2021; Barbadoro et al., 2021).

Desta forma, a redução da biodisponibilidade do NO, quer através da diminuição da produção quer através do aumento do consumo, tem sido associada a diversas doenças crónicas relevantes, incluindo a HTA. A restauração da sinalização do NO \cdot , por meio da alimentação por exemplo, torna-se então um mecanismo atrativo para influenciar positivamente e modificar os processos de DCV (Omar et al., 2016; Vanhatalo et al., 2018).

A influenciar estes resultados podem estar alguns fatores, tais como fármacos administrados por via oral que estimulem a formação de NO \cdot , a inibição da degradação do NO ou a estimulação direta das vias de sinalização a jusante (Omar et al., 2016). A utilização de colutórios com clorexidina pode também ser responsável por um desequilíbrio na cavidade oral que reduza a microflora provocando uma diminuição do NO e favorecendo o aumento dos valores de pressão arterial (Surma et al., 2021).

4. DOENÇA PERIODONTAL E HTA

Na análise da correlação entre a saúde periodontal e a hipertensão arterial puderam ser considerados os 45 participantes envolvidos no estudo, uma vez que as limitações anteriormente referidas relativas à quantificação do nitrito não interferem com os parâmetros a comparar neste tópico.

Como podemos observar na figura 14, os pacientes do grupo de estudo apresentaram uma tendência para níveis de tensão arterial mais elevados. Porém, de um ponto de vista estatístico estes valores não diferem significativamente ($p > 0,05$).

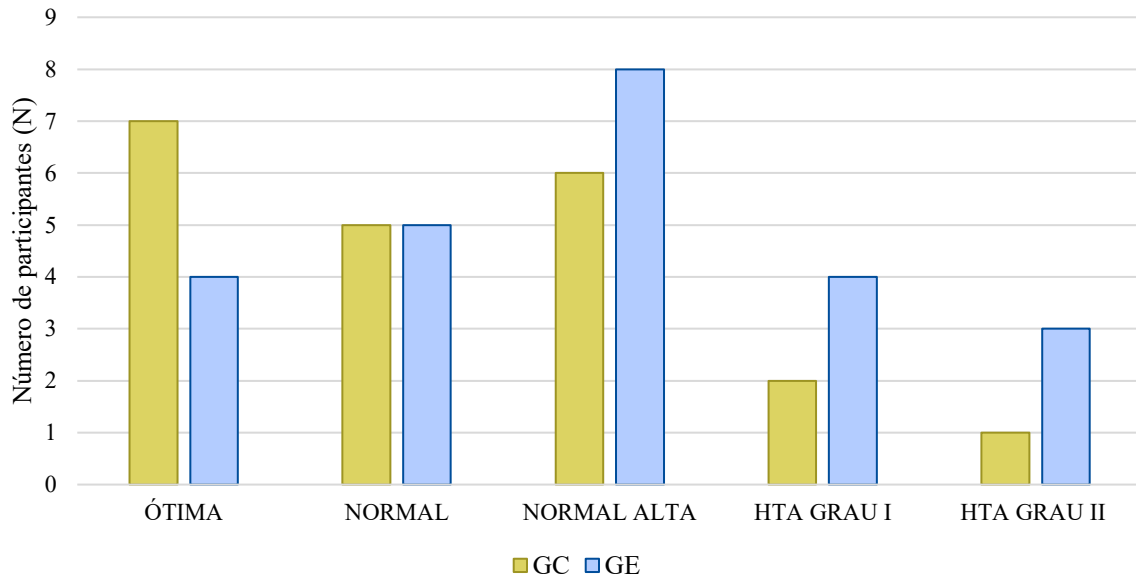


Figura 14 - Distribuição de participantes de acordo com o grau de HTA.

Evidências clínicas experimentais e observacionais sugerem um papel relevante da inflamação no desenvolvimento da hipertensão, pelo que doenças de carácter inflamatório como a periodontite devem ser consideradas como potenciadoras da HTA (Schiffirin & Engert, 2019).

Segundo a revisão de literatura realizada por Surma et al. (2021) há diversos estudos que comprovam que pacientes com doença periodontal demonstram valores de pressão arterial sistólica e diastólica mais elevados. Esta correlação pode-se dever ao facto de a DP poder atuar como uma fonte de inflamação e de stress oxidativo e poder contribuir, a longo prazo, para alterações vasculares funcionais e anatómicas, levando à rigidez arterial, ao aumento da resistência vascular e à sobrecarga de volume, havendo o consequente aumento da PA (Del Pinto et al., 2020).

Em antítese a este facto, a presença de múltiplos fatores de risco partilhados entre ambas as patologias tem sido uma das principais limitações dos estudos que sugerem esta associação, que têm sido, na sua maioria, observacionais. (Carrizales-Sepúlveda et al., 2018).

A idade, o tabagismo, o consumo de álcool, a raça/etnia, o sexo, a presença de doenças sistémicas como a *diabetes mellitus* e o excesso de peso são fatores de risco comuns que devem ser considerados como fatores de confusão, pelo que é necessário um controlo adequado dos mesmos (Lockhart et al., 2012; Aguilera et al., 2021).

5. QUANTIFICAÇÃO DE NITRATO RECORRENDO AO BIOSSENSOR NO2PROBE – RESULTADOS PRELIMINARES

No âmbito deste projeto, foi ainda realizado um pequeno estudo preliminar de forma a observar o desempenho dos biossensores NO2Probe na quantificação de nitratos presentes na saliva.

O objetivo seria a implementação de um protocolo para quantificação do nitrato com base no acoplamento do biossensor de nitrito a um sistema de redução do NO_3 em NO_2^- . Para este efeito, utilizou-se a enzima redutase do nitrato na presença do seu cofator NADPH, como descrito na secção III.2.1.

Resumidamente, o método utilizado consistiu em analisar a mesma amostra de saliva duas vezes, numa primeira fase quantificando apenas o nitrito e numa segunda fase, após incubação da amostra com os reagentes referidos anteriormente, realizando-se uma nova leitura que corresponde aos valores de nitrito total, pelo que a diferença da segunda e primeira leitura resulta no valor de nitrato presente na amostra.

Procedeu-se então à análise das amostras #39, #40 e #41 (todas do GC) com recurso à metodologia exemplificada e simultaneamente, com recurso ao método de Griess, uma vez que a exatidão deste procedimento em conjunto com a pré conversão do nitrato em nitrito já se encontra bem definido na literatura.

Os resultados obtidos encontram-se apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Concentração de NO_3 quantificadas segundo o método de Griess e com recurso ao biossensor NO2Probe.

Amostra	CONCENTRAÇÃO DE NO_3 (μM)	
	Método de Griess	Biossensor NO2Probe
#39	170,43	< 0
#40	12,73	< 0
#41	18,48	< 0

Os resultados preliminares obtidos mostraram um comportamento anómalo do biossensor de nitrito na presença de saliva após incubação com o sistema NR/NADPH, tal como podemos observar nos valores descritos na tabela 9. Ao contrário do método de Griess, as diferenças de concentrações resultaram em valores negativos, o que pode ser visto como um resultado absurdo. No entanto, outros membros da equipa obtiveram valores positivos ao utilizarem o biossensor com o mesmo protocolo, em laboratório, com recurso a amostras de solução tampão, pelo que numa primeira abordagem foi-nos possível concluir que o NO2Probe ainda não está apto para a quantificação de nitrato em contexto clínico com amostras de saliva. Uma vez que se desconhecem as razões para este comportamento, mais estudos deverão ser realizados no futuro.

V. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

O óxido nítrico é um gás altamente reativo, com propriedades antimicrobianas que desempenha um papel fisiológico em diversos sistemas, tal como o neurológico e cardiovascular. Devido a esta influência, tem sido cada vez mais estudada uma possível correlação dos seus metabolitos mais estáveis, o nitrito e o nitrato, com patologias como a doença periodontal e a hipertensão arterial. Assim, o presente estudo tinha como objetivo principal identificar possíveis correlações entre as concentrações de nitrito, a doença periodontal e a hipertensão arterial.

Ao comparar os níveis de concentrações de nitrito obtidos após a recolha de amostras, com a presença ou ausência de DP, não foi possível observar uma tendência, uma vez que os valores médios eram muito próximos e se encontravam dentro dos erros estimados para cada grupo, pelo que estatisticamente estes não eram diferentes.

Ao relacionarmos os valores de HTA medidos em cada participante com a DP e com os valores médios de nitrito, também não foi possível estabelecer diferenças estatisticamente significativas, apesar de se ter observado uma tendência para níveis de tensão arterial mais elevados em indivíduos do GE.

De forma a identificar possíveis interferências que justificassem estes resultados foram ainda realizados dois pequenos estudos adicionais, que visavam analisar as correntes catalíticas de branco de cada indivíduo (N=3) e quantificar os nitratos existentes na saliva (N=2). Apesar de terem sido utilizadas amostras muito reduzidas, foi possível extrapolar, de uma forma preliminar, que o contributo da saliva de cada indivíduo para a corrente medida pode afetar as concentrações de nitrito obtidas, pelo que no futuro devem ser realizados ensaios em branco (sem enzima ccNiR) para cada amostra. Por outro lado, conclui-se que o protocolo usado para a medição de nitrato não se adequa a amostras de saliva.

A discrepância de valores de níveis de nitrito verificada nas várias amostras pode-se dever a fatores não contemplados neste trabalho. Por conseguinte, os projetos futuros devem procurar correlacionar os valores de concentrações de nitrito com outros fatores que podem influenciar os mesmos, tal como uma avaliação mais cuidada da dieta, as concentrações de nitrito circulante na corrente sanguínea, a microflora de cada indivíduo, bem como os valores de concentração de nitrato.

Desta forma, e apesar dos resultados inconclusivos, este projeto foi fundamental para a identificação de fatores de confusão que devem ser reconhecidos e controlados em estudos posteriores, para a aprimoração do protocolo experimental e para a identificação de lacunas metodológicas nunca antes consideradas.

VII. BIBLIOGRAFIA

Almeida, M. G., et al. (2003). The isolation and characterization of cytochrome c nitrite reductase subunits (NrfA and NrfH) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Eur. J. Biochem.* 270, 3904–3915. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03772.x.

Aguilera, E. M., Suvan, J., Orlandi, M., Miró Catalina, Q., Nart, J., & D’Aiuto, F. (2021). Association between Periodontitis and Blood Pressure Highlighted in Systemically Healthy Individuals: Results from a Nested Case-Control Study. *Hypertension*, 77(5), 1765–1774. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.16790>

Almeida, M. G., Serra, A., Silveira, C. M., & Moura, J. J. G. (2010). Nitrite Biosensing via Selective Enzymes—A Long but Promising Route. *Sensors*, 10(12), 11530–11555. <https://doi.org/10.3390/s101211530>

Ashworth, A., Cutler, C., Farnham, G., Liddle, L., Burleigh, M., Rodiles, A., Sillitti, C., Kiernan, M., Moore, M., Hickson, M., Easton, C., & Bescos, R. (2019). Dietary intake of inorganic nitrate in vegetarians and omnivores and its impact on blood pressure, resting metabolic rate and the oral microbiome. *Free Radical Biology and Medicine*, 138, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.010>

Aurer, A., Aleksić, J., Ivić-Kardum, M., Aurer, J., & Čulo, F. (2001). Nitric oxide synthesis is decreased in periodontitis: Nitric oxide and periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(6), 565–568. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2001.028006565.x>

Batista, A., Silva, T., Chun, J., & Lara, V. (2002). Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease: NO in periodontal disease. *Oral Diseases*, 8(5), 254–260. <https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.02852.x>

Bellavia, L., Kim-Shapiro, D. B., & King, S. B. (2015). Detecting and monitoring NO, SNO and nitrite *in vivo*. *Future Science OA*, 1(1), fso.15.36. <https://doi.org/10.4155/fso.15.36>

Bhakta, S. A., Borba, R., Taba, M., Garcia, C. D., & Carrilho, E. (2014). Determination of nitrite in saliva using microfluidic paper-based analytical devices. *Anal*

ytica Chimica Acta, 809, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.044>

Bryan, N. S. (2015). Nitrites and Nitrates. Em *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 73–78). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00484-0>

Campbell, L., Millhouse, E., Malcolm, J., & Culshaw, S. (2016). T cells, teeth and tissue destruction – what do T cells do in periodontal disease? *Molecular Oral Microbiology*, 31(6), 445–456. <https://doi.org/10.1111/omi.12144>

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

Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T. E. (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease: Inflammatory and immune pathways in periodontal disease. *Periodontology 2000*, 64(1), 57–80. <https://doi.org/10.1111/prd.12002>

Costa, R., Resende, M., Pinto, M., & Mendes, L. (2020). Diagnóstico periodontal: Um fluxograma de decisão para a nova classificação. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 60(4). <https://doi.org/10.24873/j.rpemd.2020.01.690>

Del Pinto, R., Pietropaoli, D., Munoz-Aguilera, E., D'Aiuto, F., Czesnikiewicz-Guzik, M., Monaco, A., Guzik, T. J., & Ferri, C. (2020). Periodontitis and Hypertension: Is the Association Causal? *High Blood Pressure and Cardiovascular Prevention*, 27(4), 281–289. <https://doi.org/10.1007/s40292-020-00392-z>

Genco, R. J., & Borgnakke, W. S. (2013). Risk factors for periodontal disease: *Risk factors for periodontal diseases. Periodontology 2000*, 62(1), 59–94. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x>

Ghasemi, A. (2022). QUANTITATIVE ASPECTS OF NITRIC OXIDE PRODUCTION FROM NITRATE AND NITRITE. *EXCLI Journal*, 21, 470–486. <https://doi.org/10.17179/excli2022-4727>

Hassell, T. M. (1993). Tissues and cells of the periodontium. *Periodontology 2000*, 3(1), 9–38. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1993.tb00230.x>

Hord, N. G., Tang, Y., & Bryan, N. S. (2009). Food sources of nitrates and nitrites: The physiologic context for potential health benefits. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90(1), 1–10. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27131>

Jordan, J., Kurschat, C., & Reuter, H. (2018). Arterial Hypertension. *Deutsches Ärzteblatt International*. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0557>

Junxian, L., Mehrabian, M., Mivehchi, H., Banakar, M., & Etajuri, E. A. (2022). The homeostasis and therapeutic applications of innate and adaptive immune cells in periodontitis. *Oral Diseases*, odi.14360. <https://doi.org/10.1111/odi.14360>

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

Koch, C. D., Gladwin, M. T., Freeman, B. A., Lundberg, J. O., Weitzberg, E., & Morris, A. (2017). Enterosalivary nitrate metabolism and the microbiome: Intersection of microbial metabolism, nitric oxide and diet in cardiac and pulmonary vascular health. *Free Radical Biology and Medicine*, 105, 48–67. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.015>

Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., & Moilanen, E. (2005). Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*, 4(4), 471–479. <https://doi.org/10.2174/1568010054526359>

Li, D., Ma, Y., Duan, H., Deng, W., & Li, D. (2018). Griess reaction-based paper strip for colorimetric/fluorescent/SERS triple sensing of nitrite. *Biosensors and Bioelectronics*, 99, 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.008>

Lockhart, P. B., Bolger, A. F., Papapanou, P. N., Osinbowale, O., Trevisan, M., Levison, M. E., Taubert, K. A., Newburger, J. W., Gornik, H. L., Gewitz, M. H., Wilson, W. R., Smith, S. C., & Baddour, L. M. (2012). Periodontal Disease and Atherosclerotic Vascular Disease: Does the Evidence Support an Independent Association?: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 125(20), 2520–2544. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e31825719f3>

Lundberg, J. O., Gladwin, M. T., Ahluwalia, A., Benjamin, N., Bryan, N. S., Butler, A., Cabrales, P., Fago, A., Feelisch, M., Ford, P. C., Freeman, B. A., Frenneaux, M., Friedman, J., Kelm, M., Kevil, C. G., Kim-Shapiro, D. B., Kozlov, A. V., Lancaster, J. R., Lefer, D. J., ... Weitzberg, E. (2009). Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nature Chemical Biology*, 5(12), 865–869. <https://doi.org/10.1038/nchembio.260>

Lundberg, J. O., & Govoni, M. (2004). Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(3), 395–400. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.027>

Lundberg, J. O., Weitzberg, E., & Gladwin, M. T. (2008). The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(2), 156–167. <https://doi.org/10.1038/nrd2466>

Monteiro, T., & Almeida, M. G. (2019). Electrochemical Enzyme Biosensors Revisited: Old Solutions for New Problems. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 49(1), 44–66. <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1461552>

Monteiro, T., Gomes, S., Jubete, E., Añorga, L., Silveira, C. M., & Almeida, M. G. (2019). A quasi-reagentless point-of-care test for nitrite and unaffected by oxygen and cyanide. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39209-y>

Nanci, A., & Bosshardt, D. D. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease*. *Periodontology 2000*, 40(1), 11–28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00141.x>

Nazir, M. A. (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Sciences*, 1(2).

Nazir, M., Al-Ansari, A., Al-Khalifa, K., Alhareky, M., Gaffar, B., & Almas, K. (2020). Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *The Scientific World Journal*, 2020, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/2146160>

Omar, S. A., Webb, A. J., Lundberg, J. O., & Weitzberg, E. (2016). Therapeutic effects of inorganic nitrate and nitrite in cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Internal Medicine*, 279(4), 315–336. <https://doi.org/10.1111/joim.12441>

Pignatelli, P., Fabietti, G., Ricci, A., Piattelli, A., & Curia, M. C. (2020). How periodontal disease and presence of nitric oxide reducing oral bacteria can affect blood pressure. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21207538>

Qin, L., Liu, X., Sun, Q., Fan, Z., Xia, D., Ding, G., Ong, H. L., Adams, D., Gahl, W. A., Zheng, C., Qi, S., Jin, L., Zhang, C., Gu, L., He, J., Deng, D., Ambudkar, I. S., & Wang, S. (2012). Sialin (*SLC17A5*) functions as a nitrate transporter in the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33), 13434–13439. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116633109>

Qu, X. M., Wu, Z. F., Pang, B. X., Jin, L. Y., Qin, L. Z., & Wang, S. L. (2016). From Nitrate to Nitric Oxide: The Role of Salivary Glands and Oral Bacteria. *Journal of Dental Research*, 95(13), 1452–1456. <https://doi.org/10.1177/0022034516673019>

Ramenzoni, L. L., Lehner, M. P., Kaufmann, M. E., Wiedemeier, D., Attin, T., & Schmidlin, P. R. (2021). Oral diagnostic methods for the detection of periodontal disease. *Diagnostics*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/diagnostics11030571>

Reher, V. G. S., Zenóbio, E. G., Costa, F. O., Reher, P., & Soares, R. V. (2007). Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. *Journal of Oral Science*, 49(4), 271–276. <https://doi.org/10.2334/josnusd.49.271>

Rosier, B. T., Takahashi, N., Zaura, E., Krom, B. P., Martínez-Espinosa, R. M., van Breda, S. G. J., Marsh, P. D., & Mira, A. (2022). The Importance of Nitrate

Reduction for Oral Health. *Journal of Dental Research*, 101(8), 887–897.
<https://doi.org/10.1177/00220345221080982>

Sánchez, G. A., Miozza, V. A., Delgado, A., & Busch, L. (2014). Total salivary nitrates and nitrites in oral health and periodontal disease. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 36, 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.10.012>

Schiffrin, E. L., & Engert, J. C. (2019). Periodontitis and hypertension: Causally linked by immune mechanisms. *European Heart Journal*, 40(42), 3471–3473. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz729>

Sukuroglu, E., Güncü, G. N., Kilinc, K., & Caglayan, F. (2015). Using Salivary Nitrite and Nitrate Levels as a Biomarker for Drug-Induced Gingival Overgrowth. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00087>

Surma, S., Romańczyk, M., Witalińska-Łabuzek, J., Czerniuk, M. R., Łabuzek, K., & Filipiak, K. J. (2021). Periodontitis, Blood Pressure, and the Risk and Control of Arterial Hypertension: Epidemiological, Clinical, and Pathophysiological Aspects- Review of the Literature and Clinical Trials. *INFLAMMATION AND CARDIOVASCULAR DISEASES*. <https://doi.org/10.1007/s11906-021-01140-x/Published>

Tsikis, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, 851(1–2), 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>

Uğar-Çankal, D., & Ozmeric, N. (2006). A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. *Clinica Chimica Acta*, 366(1–2), 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.10.018>

Vanhatalo, A., Blackwell, J. R., L'Heureux, J. E., Williams, D. W., Smith, A., van der Giezen, M., Winyard, P. G., Kelly, J., & Jones, A. M. (2018). Nitrate-responsive oral microbiome modulates nitric oxide homeostasis and blood pressure in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 124, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.078>

Wallace, S. M. L., Yasmin, McEniery, C. M., Mäki-Petäjä, K. M., Booth, A. D., Cockcroft, J. R., & Wilkinson, I. B. (2007). Isolated Systolic Hypertension Is Characterized by Increased Aortic Stiffness and Endothelial Dysfunction. *Hypertension*, 50(1), 228–233. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.089391>

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

Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R, Rayner M, Townsend N (2017). European Cardiovascular Disease Statistics 2017. European Heart Network, Brussels.

World Health Organization (2019). Retrieved September 12, 2023, from <https://platform.who.int/mortality/themes/theme-details/topics/indicator-groups/indicator-group-details/MDB/hypertensive-heart-disease>

World Health Organization. (2022). Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

ANEXO 1



Comissão de Ética EGAS MONIZ

Proc. Interno nº 1195

PLATAFORMA

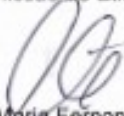
Ex.ma Senhora
Inês Silva Gomes

Monte de Caparica, 2 de março de 2023.

Ex.ma Senhora,

Em resposta ao Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado: **"Níveis de Nitrito na saliva e a sua Correlação com a Severidade da Doença Periodontal e os valores de Tensão Arterial"**, foi aprovado.

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz



Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita

ANEXO 2

CONSENTIMENTO INFORMADO



NÍVEIS DE NITRITO NA SALIVA E A SUA CORRELAÇÃO COM A SEVERIDADE DA DOENÇA PERIODONTAL E OS VALORES DE TENSÃO ARTERIAL

Consentimento informado

Data	
ID	

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, Unidade Curricular Orientação Tutorial de Projeto Final, do Instituto Universitário Egas Moniz, sob a orientação da Professora Doutora Gabriela Almeida e do Professor Doutor Ricardo Alves, solicita-se autorização para a participação no estudo "Níveis de nitrito na saliva e a sua correlação com a severidade da doença periodontal e os valores de tensão arterial", com o objetivo de comparar os níveis de nitrito em amostras de saliva em doentes com diferentes estadios da doença periodontal, que consiste na seguinte participação: recolha de amostras de saliva, medição da tensão arterial, medição da oximetria, análise do microbioma oral e aplicação de um breve questionário sociodemográfico, clínico e alimentar.

A participação neste estudo é voluntária. A sua não participação não lhe trará qualquer prejuízo.

Este estudo pode trazer benefícios, tais como validação dos níveis de nitrito como um novo marcador da doença periodontal, ao progresso do conhecimento.

A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e/ou publicação e será tratada pelos orientadores e/ou pelos seus mandatados. A sua recolha é anónima e confidencial.

(Riscar o que não interessa)

ACEITO/NÃO ACEITO participar neste estudo, confirmando que fui esclarecido sobre as condições do mesmo e que não tenho dúvidas.

(Assinatura do participante ou, no caso de menores, do pai/mãe ou tutor legal)

ANEXO 3

QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO, CLÍNICO E ALIMENTAR



NÍVEIS DE NITRITO NA SALIVA E A SUA CORRELAÇÃO COM A SEVERIDADE DA DOENÇA PERIODONTAL E OS VALORES DE TENSÃO ARTERIAL

Questionário sociodemográfico, clínico e alimentar

Data	
ID	

No âmbito da participação do estudo, responda por favor às seguintes questões.

1. Género:

<input type="checkbox"/>	Masculino
<input type="checkbox"/>	Feminino
<input type="checkbox"/>	Não-binário
<input type="checkbox"/>	Prefiro não dizer

2. Idade:

3. Peso (kg):

4. Altura (cm):

5. Valores de pressão arterial (mm Hg):

<input type="text"/>	Pressão sistólica
<input type="text"/>	Pressão diastólica

6. Valores de oximetria:

7. Diagnóstico periodontal:

8. Tomou algum antibiótico nos últimos 15 dias?

<input type="checkbox"/>	Sim
<input type="checkbox"/>	Não

9. Está grávida?

<input type="checkbox"/>	Sim
<input type="checkbox"/>	Não

10. Tem alguma das seguintes doenças?

<input type="checkbox"/>	Anemia	<input type="checkbox"/>	Cancro	<input type="checkbox"/>	Doença cardíaca congénita
<input type="checkbox"/>	Artrite	<input type="checkbox"/>	Candidíase oral	<input type="checkbox"/>	Doença da tiroide
<input type="checkbox"/>	Asma	<input type="checkbox"/>	Diabetes	<input type="checkbox"/>	Doença valvular cardíaca
<input type="checkbox"/>	Doença venérea	<input type="checkbox"/>	Febre reumática	<input type="checkbox"/>	Infeção pelo HIV
<input type="checkbox"/>	Endocardite infecciosa	<input type="checkbox"/>	Gânglios aumentados	<input type="checkbox"/>	Leucemia
<input type="checkbox"/>	Enfarte do miocárdio	<input type="checkbox"/>	Glaucoma	<input type="checkbox"/>	Osteoporose
<input type="checkbox"/>	Epilepsia	<input type="checkbox"/>	Hepatite viral	<input type="checkbox"/>	Pacemaker
<input type="checkbox"/>	Tosse persistente	<input type="checkbox"/>	Tratamento psiquiátrico	<input type="checkbox"/>	Tuberculose
<input type="checkbox"/>	Úlcera gástrica	<input type="checkbox"/>	Úlcera duodenal	<input type="checkbox"/>	Hipertensão arterial
<input type="checkbox"/>	DPOC	<input type="checkbox"/>	Outro:		



11. Toma algum dos seguintes medicamentos?

<input type="checkbox"/>	Anti-hipertensores	<input type="checkbox"/>	Antiácidos	<input type="checkbox"/>	Analgésicos
<input type="checkbox"/>	Broncodilatadores	<input type="checkbox"/>	Estatinas	<input type="checkbox"/>	Aspirina
<input type="checkbox"/>	Antidepressivos	<input type="checkbox"/>	Antidiabéticos	<input type="checkbox"/>	Esteroides
<input type="checkbox"/>	Antipsicóticos	<input type="checkbox"/>	Bifosfonatos	<input type="checkbox"/>	Anticoagulantes
<input type="checkbox"/>	Anticoncecionais	<input type="checkbox"/>	Outro:		

12. Tem alguma alergia?

<input type="checkbox"/>	Sim
<input type="checkbox"/>	Especifique: _____
<input type="checkbox"/>	Não

13. Utiliza alguma pasta para dentes sensíveis?

<input type="checkbox"/>	Sim
<input type="checkbox"/>	Não

14. Utiliza algum colutório?

<input type="checkbox"/>	Sim
<input type="checkbox"/>	Não

15. Quando foi a sua última refeição e o que é que ingeriu?

16. É fumador/a?

<input type="checkbox"/>	Não, nunca fumei.
<input type="checkbox"/>	Não, mas sou ex-fumador Quantos anos fumou? _____ Há quando tempo deixou de fumar? _____ Quantos cigarros fumava por dia? _____
<input type="checkbox"/>	Sim Há quantos anos fuma? _____ Quantos cigarros fuma por dia? _____

17. Costuma ingerir bebidas alcoólicas?

<input type="checkbox"/>	Não
<input type="checkbox"/>	Sim ____ Raramente (>1 vezes por mês) ____ Ocasionalmente (2/3 vezes por mês) ____ Frequentemente (várias vezes por mês)

18. Costuma consumir drogas?

<input type="checkbox"/>	Não
<input type="checkbox"/>	Sim ____ Raramente (>1 vezes por mês) ____ Ocasionalmente (2/3 vezes por mês) ____ Frequentemente (várias vezes por mês)

19. Qual a quantidade de água que ingere por dia?

<input type="checkbox"/>	Menos de 1L
<input type="checkbox"/>	1L a 3L
<input type="checkbox"/>	3L

20. Costuma ter uma dieta rica em vegetais e fruta?

<input type="checkbox"/>	Não
<input type="checkbox"/>	Sim. Ingere habitualmente (3-4 vezes por semana) algum destes alimentos?
<input type="checkbox"/>	Menos de 120 g de espinafres não cozinhados
<input type="checkbox"/>	Mais de 120 g de espinafres não cozinhados
<input type="checkbox"/>	Menos de 120 g de beterraba
<input type="checkbox"/>	Mais de 120 g de beterraba
<input type="checkbox"/>	Menos de 120g de couve
<input type="checkbox"/>	Mais de 120g de couve
<input type="checkbox"/>	Menos de 120g de bebida vegetal
<input type="checkbox"/>	Mais de 120g de bebida vegetal
<input type="checkbox"/>	Menos de 120g de sumo de romã
<input type="checkbox"/>	Mais de 120g de sumo de romã
<input type="checkbox"/>	Menos de uma banana
<input type="checkbox"/>	Mais do que uma banana
<input type="checkbox"/>	Menos de uma laranja
<input type="checkbox"/>	Mais de uma laranja

21. Costuma ter uma dieta rica em carnes processadas?

<input type="checkbox"/>	Não
<input type="checkbox"/>	Sim. Diariamente, durante a sua refeição a quantidade de carnes processadas consumida é de:
<input type="checkbox"/>	< de 30g de bacon (estimativa de 3 fatias de 10g)
<input type="checkbox"/>	> de 30g de bacon
<input type="checkbox"/>	< de 60g de fiambre (estimativa de 3 fatias de 20g)
<input type="checkbox"/>	> de 60g de fiambre
<input type="checkbox"/>	< de 75g de salsichas (estimativa de 3 fatias de 25g)
<input type="checkbox"/>	> de 75g de salsichas

22. Está a fazer alguma suplementação vitamínica?

<input type="checkbox"/>	Não
<input type="checkbox"/>	Sim. Qual? _____

23. Está a fazer algum outro tipo de suplemento alimentar?

<input type="checkbox"/>	Não
<input type="checkbox"/>	Sim. Qual? _____

24. Costuma sentir sensação de boca seca?

<input type="checkbox"/>	Não
<input type="checkbox"/>	Sim.
<input type="checkbox"/>	Ocasionalmente
<input type="checkbox"/>	Frequentemente
<input type="checkbox"/>	Todos os dias

25. Costuma sentir alguma das seguintes condições?

<input type="checkbox"/>	Stress psicológico
<input type="checkbox"/>	Ansiedade
<input type="checkbox"/>	Cansaço físico

Obrigado pela sua participação.

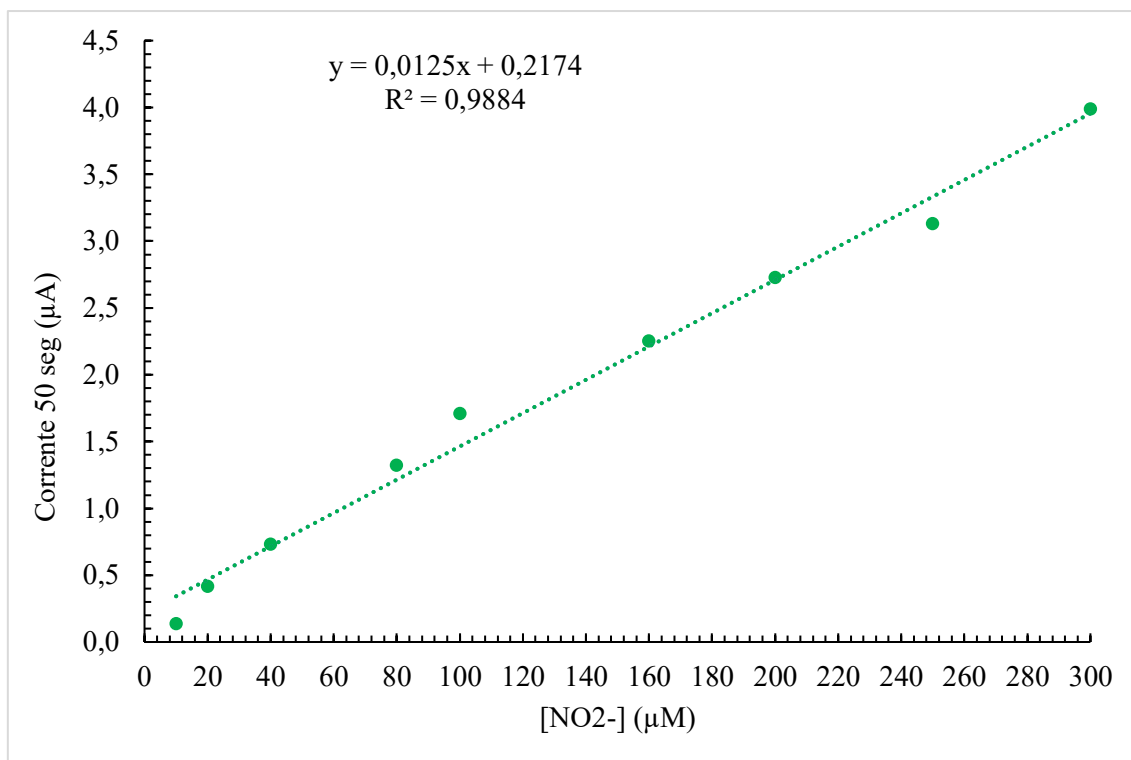
ANEXO 4

Valores de corrente catalítica em branco utilizados ao longo do projeto.

DIA	CORRENTE (μA)
09.05.2023	0,201
30.05.2023	0,198
06.06.2023	0,204
20.06.2023	0,196
18.07.2023	0,201
21.07.2023	0,194
25.07.2023	0,194
28.07.2023	0,191
19.09.2023	0,220

ANEXO 5

Reta de calibração realizada dia 08/05/2023



Reta de calibração realizada dia 17/07/2023

