



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**FOSFATASE ALCALINA E ASPARTATO AMINOTRANSFERASE
COMO BIOMARCADORES DE PERI-IMPLANTITE: ESTUDO
PILOTO**

Trabalho submetido por
Yana Slovinska
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2019



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**FOSFATASE ALCALINA E ASPARTATO AMINOTRANSFERASE
COMO BIOMARCADORES DE PERI-IMPLANTITE: ESTUDO
PILOTO**

Trabalho submetido por
Yana Slovinska
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Ricardo Alves

e coorientado por
Prof. Doutora Madalena Salema Oom

setembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Ricardo Alves por toda a disponibilidade, todo empenho e rigor que sempre demonstrou ao longo deste projeto. Por toda a partilha de conhecimento e motivação que sempre me deu.

À Prof. Doutora Madalena Oom por sempre me incentivar, por toda a disponibilidade, por toda ajuda e por toda a dedicação que deu a este trabalho.

Aos meus pais, por todo o amor e sacrifício, por sempre me apoiarem incondicionalmente, por sempre acreditarem em mim e nunca me deixarem baixar a cabeça ou desistir. Sem vocês isto nunca teria sido possível.

À minha irmã, Alexandra, que apesar de me dar muitas dores de cabeça sempre me deu força para lutar para alcançar todos os meus objetivos.

Ao meu namorado, Enzo, por todo o carinho, amor e por ter estado ao meu lado em todos os momentos tanto nos mais difíceis como nos mais importantes.

À toda a minha família, por todas as palavras de incentivo e por sempre terem acreditado em mim.

Às minhas amigas, Bárbara, Catariana, Joana e Rita, que sempre estiveram do meu lado desde o início e tornaram estes anos inesquecíveis, por toda a amizade e por todos os momentos vividos que vou recordar de coração cheio. Em especial a minha colega de box, Joana, por nestes dois últimos anos termos feito uma dupla imbatível.

Ao Prof. Doutor Luís Proença, por toda a disponibilidade e ajuda que me deu na estatística dos resultados.

Às Técnicas de apoio laboratorial, por toda a ajuda que me deram no laboratório e disponibilidade que sempre demonstraram ao longo deste projeto.

À equipa da Pós-Graduação e Assistencial de Periodontologia, por toda a paciência que tiveram e toda a ajuda que me deram.

A todos os que aceitaram participar neste estudo, e tornaram este estudo possível.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, por me ter proporcionados os melhores cinco anos da minha vida e por me ter feito conhecer pessoas que vou levar para o resto da vida.

E por fim, obrigada a todos os docentes da Clínica Egas Moniz, que me ajudaram a crescer como pessoa e por tudo o que me ensinaram.

O meu sincero obrigada a todos!

RESUMO

Objetivo: Avaliar a atividade enzimática da fosfatase alcalina e da aspartato aminotransferase como biomarcadores para o diagnóstico precoce da peri-implantite.

Materiais e Métodos: Estudo experimental realizado em 22 pacientes (n=22) que compareceram na Clínica Universitária Egas Moniz. Os participantes foram divididos em quatro grupos: grupo controlo incluindo pacientes com implantes saudáveis (n=5), grupo com pacientes com peri-implantite mas com saúde periodontal (n=7), grupo com pacientes com peri-implantite e com doença periodontal (n=7) e um grupo de pacientes com implantes saudáveis mas com doença periodontal (n=3). Foi efetuada a recolha do líquido crevicular com cones de papel esterilizados e determinada a atividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP) e da aspartato aminotransferase (AST) por espectrofotometria. Foi também avaliado o perfil proteico por eletroforese 1D (SDS-PAGE).

Resultados: A atividade enzimática da ALP foi maior nos pacientes com peri-implantite e com doença periodontal ($0,089 \pm 0,02$ U/ml) e menor nos pacientes com implantes saudáveis ($0,021 \pm 0,02$ U/ml) embora sem uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,075$). A atividade da AST, tal como observado na ALP, foi maior nos pacientes com peri-implantite e com doença periodontal ($1,79 \pm 0,7$ U/ml) e menor nos pacientes com implantes saudáveis ($0,45 \pm 0,3$ U/ml), ($p=0,167$). O perfil proteómico, das amostras reunidas por grupo, revelou diferenças na intensidade de algumas bandas das amostras com doença em relação às do grupo das amostras com implantes saudáveis.

Conclusões: O aumento da atividade enzimática da ALP e AST na presença de doença peri-implantar sem significado estatístico, aponta para a necessidade de avaliar as amostras por grau de severidade da doença antes de concluir sobre a sua utilidade no diagnóstico. O perfil de proteínas mostrou algumas diferenças promissoras entre a amostra saudável e as amostras com doença que poderão ser exploradas na tentativa de encontrar um biomarcador específico.

Palavras-chave: Aspartato aminotransferase, biomarcadores, fosfatase alcalina e peri-implantite.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the enzymatic activity of alkaline phosphatase and aminoaminotransferase as potential biomarkers for early peri-implant diagnosis.

Materials and Methods: Experimental study conducted on 22 patients (n=22) who attended the Egas Moniz University Clinic. Participants were divided into four groups: control group including patients with healthy implants (n=5), group with patients with peri-implantitis and periodontal health (n=7), group with patients with peri-implantitis and periodontal disease (n=7) and a group of patients with healthy implants and periodontal disease (n=3). Crevicular fluid was collected with sterile paper points and the enzymatic activity of alkaline phosphatase (ALP) and aspartate aminotransferase (AST) was determined by spectrophotometry. The protein profile was also evaluated by 1D electrophoresis (SDS-PAGE).

Results: The enzymatic activity of ALP was higher in patients with peri-implantitis and periodontal disease ($0,089 \pm 0,02$ U/ml) and lower in patients with healthy implants ($0,021 \pm 0,02$ U/ml) although without a statistically significant differences ($p=0,075$). AST activity, as observed in ALP, was higher in patients with peri-implantitis and periodontal disease ($1,79 \pm 0,7$ U/ml) and lower in patients with healthy implants ($0,45 \pm 0,3$ U/ml) ($p=0,167$). The proteomic profile of the pooled samples revealed differences in the intensity of some bands of the disease samples compared to the healthy implant group.

Conclusion: The increased enzymatic activity of ALP and AST in the presence of peri-implant disease without statistical significance points to the need to evaluate samples for disease severity before concluding on their usefulness in the diagnosis. The protein profile showed some promising differences between the healthy sample and the disease samples that could be explored in an attempt to find a specific biomarker.

Key words: Aspartate aminotransferase, biomarkers, alkaline phosphatase and peri-implantitis.

ÍNDICE GERAL

| | | |
|-------------|---|-----------|
| I. | INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1. | Epidemiologia das Doenças Peri-implantares..... | 15 |
| 1.2. | Etiopatogênese das Doenças Peri-implantares | 16 |
| 1.3. | Caracterização da Mucosite Peri-implantar e Peri-implantite | 17 |
| 1.4. | Fluído Crevicular Peri-implantar | 18 |
| 1.5. | Diagnóstico de Mucosite Peri-implantar e Peri-implantite | 19 |
| 1.5.1. | Parâmetros Clínicos e Radiográficos..... | 19 |
| 1.5.2. | Biomarcadores | 22 |
| 1.5.2.1. | Fosfatase Alcalina (ALP) | 24 |
| 1.5.2.2. | Aspartato Aminotransferase (AST)..... | 25 |
| 1.6. | Tratamento das Doenças Peri-implantares..... | 25 |
| 1.6.1. | Tratamento da mucosite | 26 |
| 1.6.2. | Tratamento da peri-implantite | 26 |
| II. | HIPÓTESES | 29 |
| III. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 31 |
| 3.1. | Considerações éticas..... | 31 |
| 3.2. | Tipo de estudo | 31 |
| 3.3. | Local de estudo | 31 |
| 3.4. | Amostra | 31 |
| 3.4.1. | Seleção da amostra | 31 |
| 3.4.2. | CrITÉRIOS de inclusÃO | 32 |
| 3.4.3. | CrITÉRIOS de exclusÃO | 32 |
| 3.5. | Materiais..... | 32 |
| 3.5.1. | Para observação do paciente e recolha da amostra..... | 32 |
| 3.5.2. | Para determinação das atividades enzimáticas | 33 |
| 3.5.3. | SDP-PAGE | 33 |
| 3.6. | Protocolo Clínico | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 3.7. Estudo Laboratorial | 35 |
| 3.7.1. Análise da Fosfatase Alcalina | 36 |
| 3.7.2. Análise da Aspartato Aminotransferase | 36 |
| 3.7.3. SDS-PAGE | 37 |
| 3.8. Análise Estatística..... | 38 |
| IV. RESULTADOS | 39 |
| 4.1. Caracterização da amostra | 39 |
| 4.2. Comparação da atividade da ALP nos três grupos..... | 42 |
| 4.3. Comparação da atividade da AST nos três grupos | 43 |
| 4.4. Análise das proteínas totais do fluido crevicular por SDP-PAGE..... | 44 |
| V. DISCUSSÃO | 47 |
| VI. CONCLUSÃO..... | 51 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | 53 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Radiografia peri-apical de um implante saudável. | 17 |
| Figura 2: Radiografia peri-apical de um implante com peri-implantite..... | 18 |
| Figura 3: Esquema: a) mucosa peri-implantar saudável; b) mucosite peri-implantar; c) peri-implantite. (Adaptado de Lindhe & Lang, 2015)..... | 18 |
| Figura 4: Recolha do PICF com um cone de papel esterilizado (cortesia do Professor Ricardo Alves)..... | 35 |
| Figura 5: Medição da perda óssea numa radiografia peri-apical. | 35 |
| Figura 6: Análise da atividade da Fosfatase Alcalina (ALP): A) amostras e B) curva de calibração..... | 36 |
| Figura 7: Análise da atividade da Aspartato Aminotranferase (AST), Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich): A) amostra, B) curva de calibração e C) amostras de controlo. | 37 |
| Figura 8: Equipamento de eletroforese com as amostras aplicadas no gel. | 38 |
| Figura 9: Análise por SDP-PAGE (12%) das proteínas totais do fluído crevicular de implantes saudáveis (1) , com peri-implantite e com periodonto saudável (2) , com peri-implantite e com doença periodontal (3) e implantes saudáveis com doença periodontal (4) . Marcador de massas moleculares (M) . A seta indica a massa molecular de proteína do marcador e a linha a tracejado a massa molecular calculada de proteínas comuns nas quatro amostras..... | 44 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Diagnóstico peri-implantar segundo Berglundh et al. (2018). | 21 |
| Tabela 2: Classificação da peri-implantite segundo Froum e Rosen (2012). | 22 |
| Tabela 3: Protocolo de Terapia de Suporte Intercetiva Cumulativa (CIST), (adaptado de Lang et al., 2004) | 27 |
| Tabela 4: Resultados da atividade da ALP nos três grupos. Os valores representam a média \pm desvio padrão. | 42 |
| Tabela 5: Resultados da atividade da AST nos três grupos. Os valores representam a média \pm desvio padrão. | 43 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1: Distribuição dos pacientes por género na amostra estudada..... | 39 |
| Gráfico 2: Distribuição dos participantes de acordo com o diagnóstico..... | 40 |
| Gráfico 3: Frequência da severidade da peri-implantite no grupo 2: leve (n=1), moderada (n=4) e severa (n=2)..... | 41 |
| Gráfico 4: Frequência da severidade da peri-implantite no grupo 3: leve (n=3), moderada (n=3) e severa (n=1)..... | 41 |
| Gráfico 5: Atividade enzimática da ALP em função do estado de saúde peri-implantar. O gráfico revela os quartis inferior e superior e a mediana (caixa azul). Os valores adjacentes marcam os menores e os maiores valores não declarados como <i>outliers</i> | 42 |
| Gráfico 6: Atividade enzimática da AST em função do estado de saúde peri-implantar. O gráfico revela os quartis inferior e superior e a mediana (caixa azul). Os valores adjacentes marcam os menores e os maiores valores não declarados como <i>outliers</i> | 43 |

LISTA DE SIGLAS

- AAP** - Academia Americana de Periodontologia
- HS** - Hemorragia à sondagem
- PS** - Profundidade de sondagem
- CBCT** - Tomografia computadorizada de feixe cônico
- TC** - Tomografia computadorizada
- FCPI** - Flúido crevicular peri-implantar
- IL-1 β** - Interleucina-1 beta
- TNF- α** - Fator de necrose tumoral alfa
- IL-6** - Interleucina-6
- IL-8** - Interleucina-8
- MMP** - Metaloproteinases da matriz
- MPO** - Mieloperoxidase
- ALP** - Fosfatase alcalina
- CTSK** - Catepsina-K
- AST** - Aspartato aminotransferase
- MMP-8** - Metaloproteinase da matriz de fibroblasto-8
- CIST** - Terapia de Suporte Intercetiva Cumulativa

I. INTRODUÇÃO

Os implantes osteointegrados são uma opção cada vez mais utilizada na reposição de dentes perdidos, apresentando uma elevada taxa de sucesso e previsibilidade. Contudo, para atingirmos o sucesso a longo prazo, torna-se importante termos em conta os fatores que podem levar ao fracasso do tratamento. Um dos motivos da falha dos implantes são as complicações biológicas que são classificadas em duas categorias: a mucosite e a peri-implantite (Berglundh et al., 2018).

A mucosite peri-implantar é definida como a presença de um infiltrado inflamatório no tecido mole devido à acumulação de placa bacteriana, sem perda de tecido ósseo peri-implantar, enquanto a peri-implantite é uma inflamação nos tecidos peri-implantares com perda de osso de suporte (Lindhe & Meyle, 2008). Se não existir um diagnóstico e tratamento precoce pode ocorrer a perda de osteointegração e consequentemente a perda do implante dentário (Bohner et al., 2017).

1.1. Epidemiologia das Doenças Peri-implantares

Estima-se que a mucosite peri-implantar afete 43% a 48% dos implantes colocados (Jepsen et al., 2015; Yaghobee, Khorsand, Ghohroudi, Sanjari, & Kadkhodazadeh, 2014). No entanto, existem dados controversos relativamente à prevalência das patologias peri-implantares, sendo estas influenciadas pela definição dos casos nomeadamente a extensão e a gravidade da doença (Salvi, Cosgarea, & Sculean, 2017). Esta variação também pode ser justificada por incoerências e carências metodológicas (Sanz & Chapple, 2012).

Diversos estudos têm avaliado a prevalência da peri-implantite, que varia em função dos parâmetros analisados, sendo um deles o intervalo de tempo desde que o implante está em função. No relatório do Oitavo Workshop Europeu de Periodontologia, foi aconselhado a incorporação nas estatísticas de implantes que tenham estado em função durante tempo suficiente, não havendo um tempo preestabelecido (Sanz & Chapple, 2012). Num estudo de Marrone, Lasserre, Bercy, & Brex (2013) a prevalência de peri-implantite em implantes com mais de dez anos em função foi de 38,4% e em implantes em função entre 5 a 10 anos foi de 17,6 %.

Outro dos parâmetros considerado é a presença de doença periodontal. A prevalência da peri-implantite em pacientes com doença periodontal ativa foi de 57,1%. O mesmo estudo indica que um paciente com periodontite que não realize as consultas de suporte periodontal tem maior probabilidade do implante apresentar peri-implantite após cinco anos da sua colocação (Marrone et al., 2012). A diferença na prevalência da peri-implantite após cinco anos da colocação do implante em pacientes que aderiram ou não à terapia de suporte, foi respectivamente de 18% e 43,9% (Jepsen et al., 2015).

1.2. Etiopatogênese das Doenças Peri-implantares

A etiologia da peri-implantite é semelhante à etiologia da periodontite, estando associada a diversas reações da cascata de fatores, tanto do hospedeiro como microbianos, que levam à perda de tecidos moles e duros (Kuula et al., 2009). A acumulação de biofilme bacteriano tem sido apontada como o principal fator etiológico da mucosite e da peri-implantite (Berglundh et al., 2018). Na peri-implantite ocorrem reações imuno-osteolíticas em torno do implante dentário que são responsáveis pela reabsorção óssea conduzindo à perda óssea marginal (Albrektsson, Canullo, Cochran, & De Bruyn, 2016). No entanto, a peri-implantite também pode ser iniciada e/ou mantida devido a fatores iatrogênicos como por exemplo o mau posicionamento do implante, complicações técnicas ou excessos de cimento (Lang & Berglundh, 2011).

A microflora peri-implantar saudável é semelhante à de um dente saudável e é principalmente composta por cocos gram-positivo, bacilos não móveis e um reduzido número de espécies anaeróbias gram-negativo. Quando estamos perante uma mucosite, uma condição semelhante à gengivite, verifica-se um aumento no número de cocos, bacilos móveis e espiroquetas. Na peri-implantite, condição semelhante à periodontite, observa-se um aumento no número de espécies gram-negativo, móveis e anaeróbias incluindo as três espécies do complexo vermelho: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (Mombelli & Décaillet, 2011). No entanto, existem algumas diferenças em relação à doença periodontal pois nas lesões peri-implantares encontram-se bactérias que não fazem parte do grupo de microrganismos periodontopatogênicos clássicos. Por exemplo, *Staphylococcus aureus*, que mostrou ter elevada afinidade com o titânio, desempenhando uma função importante na evolução da doença peri-implantar (Rakic, Grusovin, & Canullo, 2016; Smeets et al., 2014). As

bactérias patogênicas mais frequentemente associadas a este processo são as bactérias gram-positivo como *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* (Wang & Ren, 2017).

1.3. Caracterização da Mucosite Peri-implantar e Peri-implantite

A saúde peri-implantar é caracterizada pela ausência de sinais visuais de inflamação nomeadamente eritema, edema, supuração e hemorragia à sondagem, podendo o tecido ósseo estar normal ou reduzido (Figura 1). Não é possível definir um intervalo de profundidades de sondagem compatível com a saúde peri-implantar. Histologicamente, a porção da mucosa peri-implantar que está voltada para o implante é constituída por uma porção "coronal" revestida por um epitélio sulcular e um epitélio juncional fino e um segmento mais "apical" no qual o tecido conjuntivo está em contato direto com a superfície do implante (Berglundh et al., 2018).

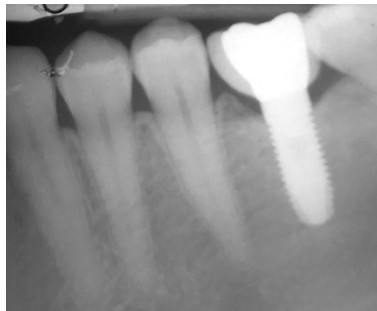


Figura 1: Radiografia peri-apical de um implante saudável.

Clinicamente, a mucosite peri-implantar é caracterizada como uma doença reversível na qual existe a presença de inflamação limitada aos tecidos moles em torno do implante dentário, sem evidência de perda óssea após a remodelação óssea inicial decorrente da cicatrização. Caso esta não seja tratada, pode evoluir para peri-implantite, uma condição patológica na qual existe um processo inflamatório que envolve os tecidos moles e duros, havendo uma perda progressiva de tecido de suporte (Figura 2) após o período de remodelação biológica do osso como esquematizado na Figura 3 (Berglundh et al., 2018; Sanz & Chapple, 2012).

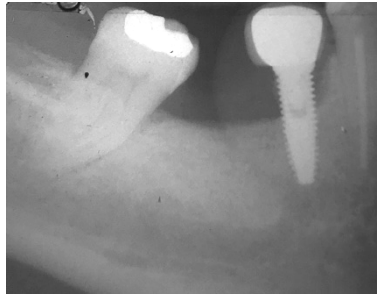


Figura 2: Radiografia peri-apical de um implante com peri-implantite.

Histologicamente, a mucosite peri-implantar caracteriza-se por uma lesão inflamatória limitada, lateral ao epitélio juncional da bolsa, com infiltrado abundante em estruturas vasculares, plasmócitos e linfócitos. As lesões da peri-implantite caracterizam-se pela extensão apical ao epitélio juncional e pela elevada concentração de plasmócitos, neutrófilos e macrófagos (Berglundh et al., 2018).

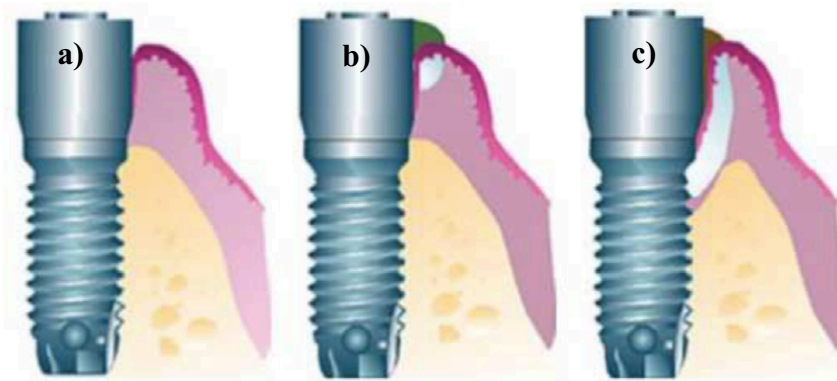


Figura 3: Esquema: **a)** mucosa peri-implantar saudável; **b)** mucosite peri-implantar; **c)** peri-implantite. (Adaptado de Lindhe & Lang, 2015).

1.4. Flúido Crevicular Peri-implantar

O flúido crevicular é um exsudado inflamatório composto por soro e compostos como produtos de degradação tecidual, mediadores inflamatórios, proteínas, enzimas e anticorpos. Os constituintes do flúido são derivados do soro, tecido conjuntivo e epitélio. Este flúido tem uma função importante na manutenção da estrutura do epitélio juncional e na defesa antimicrobiana. A quantidade de flúido presente varia em função do estado de saúde dos tecidos peri-implantares, sendo que num sulco saudável a sua quantidade é muito menor. A principal forma de disseminação é através da membrana basal e, de seguida, pelo epitélio juncional no sulco (Subbarao et al., 2019). Alguns dos componentes

do fluido crevicular também variam em função do estado de saúde do implante, nomeadamente o nível de peptidases neutras são mais altos na presença de inflamação moderada a grave, assim como, o nível de IL-1 β é três vezes maior em torno dos implantes com doença peri-implantar (Subbarao et al., 2019).

Existem vários fatores que estimulam o fluxo do fluido crevicular como a inflamação gengival, a mastigação de alimentos duros, a existência de bolsas profundas, o ritmo circadiano (aumento gradual das 6h às 23h), o aumento da temperatura corporal, ovulação, as hormonas sexuais, os contraceptivos hormonais e o tabagismo (Subbarao et al., 2019). O aumento da inflamação gengival, leva ao aumento da permeabilidade do epitélio gengival, que por sua vez leva ao aumento do fluxo do líquido crevicular (Attar, Banodkar, Gaikwad, Patil, & Simon, 2018).

Este líquido é muito rico em diversos compostos que têm sido estudados como potenciais biomarcadores. Torna-se assim importante a escolha do método adequado para a recolha do mesmo. Os métodos que podem ser utilizados são: micropipetas, lavagens creviculares e tiras ou cones de papel absorvente. Os cones e as tiras de papel são um método rápido, de fácil utilização e atraumático. Sendo que o mais recomendado entre estes dois últimos métodos são as tiras de papel porque têm maior taxa de recuperação de certos compostos (Attar et al., 2018).

1.5. Diagnóstico de Mucosite Peri-implantar e Peri-implantite

1.5.1. Parâmetros Clínicos e Radiográficos

A mucosite peri-implantar é caracterizada por sinais clínicos de inflamação como eritema, edema e/ou supuração, sendo apontada como principal característica a hemorragia à sondagem. Pode também ser observado um aumento de profundidade de sondagem devido ao edema ou diminuição na resistência à sondagem, sem evidência de perda óssea além da remodelação óssea inicial (Berglundh et al., 2018). O parâmetro chave para o diagnóstico de mucosite é a ocorrência de hemorragia à sondagem suave (0,25N) (Lang & Berglundh, 2011).

A peri-implantite não é uma doença que tenha manifestações clínicas imediatamente após o seu início, pelo que quando estas surgem já existem sequelas irreversíveis. Derks et al. (2016) observaram que pacientes diagnosticados com peri-implantite moderada/grave, tiveram o início da doença três anos antes, verificando-se um modelo de aceleração não linear durante nove anos.

Em relação à avaliação radiográfica foi realizado um estudo em que se realizou a comparação da eficácia de diversas técnicas, nomeadamente a ortopantomografia e radiografia intraoral (técnicas bidimensionais), tomografia computadorizada de feixe cónico (CBCT) e tomografia computadorizada (TC) (técnicas tridimensionais) na identificação dos diferentes defeitos ósseos peri-implantares, concluindo-se que a radiografia intraoral é um meio aconselhável para se utilizar na identificação de perda óssea em torno do implante dentário e a ortopantomografia mostrou ser a menos eficaz no reconhecimento de perda peri-implantar. O CBCT e o TC são meios recomendáveis, no entanto, devem ser utilizados apenas em situações particulares devido à sua elevada radiação e custo (Bohner et al., 2017; Kühn et al., 2016).

No Workshop Mundial de Periodontologia de 2017 foram discutidas as diversas lacunas na classificação das doenças peri-implantares com o objetivo de se estabelecerem critérios precisos e rigorosos para a definição de saúde, mucosite peri-implantar e peri-implantite, que permitam a realização de um correto diagnóstico destas patologias. É recomendado que o clínico realize uma radiografia após a carga do implante de forma a determinar uma referência do nível ósseo após a remodelação fisiológica e faça a medição das profundidades de sondagem, de forma a serem utilizados como um auxílio num posterior diagnóstico peri-implantar. Na presença de exames clínicos e radiográficos anteriores, o diagnóstico de saúde peri-implantar requer ausência de sinais clínicos de inflamação e de hemorragia e/ou supuração à sondagem suave, nenhum aumento da profundidade de sondagem (PS) (sendo que esta depende da altura do tecido mole em torno do implante) e ausência de perda óssea para além da remodelação óssea inicial. Por outro lado, o diagnóstico da mucosite peri-implantar requer a presença de hemorragia e/ou supuração à sondagem suave, com ou sem aumento da PS e ausência de perda óssea para além da remodelação óssea inicial. Ambas as condições, podem existir em torno de implantes com diferentes níveis de suporte ósseo. O diagnóstico da peri-implantite requer a presença de hemorragia e/ou supuração à sondagem suave, aumento de PS e presença

de perda óssea. Na ausência de exames anteriores, foram propostos os seguintes critérios para o diagnóstico da peri-implantite: presença de hemorragia e/ou supuração à sondagem suave, PS ≥ 6 mm e níveis ósseos apicais ≥ 3 mm da porção mais coronária da porção intraóssea do implante, como resumido na Tabela 1 (Berglundh et al., 2018).

Tabela 1: Diagnóstico peri-implantar segundo Berglundh et al. (2018).

| | PRESENÇA DE EXAMES PRÉVIOS | | | AUSÊNCIA DE EXAMES PRÉVIOS |
|---|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|
| | Saúde Peri-implantar | Mucosite Peri-implantar | Peri-implantite | Peri-implantite |
| Sinais inflamatórios | Ausente | Hemorragia e/ou supuração à sondagem | Hemorragia e/ou supuração à sondagem | Hemorragia e/ou supuração à sondagem |
| Profundidade de sondagem | Ausente | Presente ou ausente | Aumento da PS | ≥ 6 mm |
| Perda óssea após a remodelação óssea inicial | Ausente | Ausente | Presente | Nível ósseo ≥ 3 mm para apical da porção mais coronária da porção intraóssea do implante |

A ocorrência isolada de hemorragia à sondagem não é obrigatoriamente sinal de peri-implantite (Cionca, Hashim, Cancela, Giannopoulou, & Mombelli, 2016).

A correlação entre a profundidade de sondagem e a perda óssea tem sido apontada como um indicador da gravidade da peri-implantite (Berglundh et al., 2018). A peri-implantite pode ser classificada em três graus de gravidade, precoce, moderada e avançada, como resumido na Tabela 2 (Froum & Rosen, 2012). A perda óssea deve ser avaliada comparando a radiografia atual com a tirada após a colocação da supra-estrutura (Froum & Rosen, 2012).

Tabela 2: Classificação da peri-implantite segundo Froum e Rosen (2012).

| Classificação | Características clínicas |
|----------------------|--|
| Precoce | PS \geq 4 mm (HS e/ou supuração à sondagem) Perda óssea < 25% do comprimento do implante |
| Moderada | PS \geq 6 mm (HS e/ ou supuração à sondagem) Perda óssea 25% a 50% do comprimento do implante |
| Avançada | PS \geq 8 mm (HS e/ou supuração à sondagem) Perda óssea > 50% do comprimento do implante |

PS=Profundidade de sondagem, HS=Hemorragia à sondagem.

1.5.2. Biomarcadores

Os meios de diagnóstico, tanto clínicos como radiográficos, fazem com que o médico dentista se depare com elevada dificuldade em realizar um diagnóstico específico que distinga o início, a evolução e a atividade da doença. Para apoiar o médico no diagnóstico, têm vindo a ser estudados diversos biomarcadores, que são moléculas de resposta do hospedeiro, para a identificação antecipada da destruição peri-implantar e monitorização da progressão da perda óssea em combinação com a avaliação clínica (Dursun & Tözüm, 2016; Li & Wang, 2014; Wang et al., 2016).

O fluido crevicular peri-implantar (FCPI), fluido que se encontra em volta do implante, é um fluido muito idêntico ao fluido crevicular produzido pelos tecidos à volta dos dentes naturais tendo na sua constituição vários componentes que podem ser possíveis biomarcadores (Wang et al., 2016).

O FCPI é um exsudado cuja composição se assemelha à do soro e a intensidade do seu fluxo varia em função da inflamação gengival, sendo considerado um meio promissor para a identificação da atividade da doença periodontal (Gupta, Chhina, & Arora, 2018), assim como, para a identificação da peri-implantite (Dursun & Tözüm, 2016) tendo como vantagem poder ser recolhido de forma não invasiva (Wang et al., 2016).

Existem diversos biomarcadores no FCPI nomeadamente as citocinas pró inflamatórias principalmente a interleucina-1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-8 (IL-8), as metaloproteinases da matriz (MMP), as enzimas como a mieloperoxidase (MPO), a fosfatase alcalina (ALP), a elastase, a catepsina-K (CTSK) e a aspartato aminotransferase (AST) (Dursun & Tözüm, 2016; Gupta et al., 2018). Uma revisão recente refere que os biomarcadores mais utilizados para o auxílio no diagnóstico da peri-implantite são os mediadores inflamatórios como a IL-1 β e o TNF- α (Dursun & Tözüm, 2016).

Um estudo que avaliou as citocinas pró-inflamatórias no FCPI como potenciais biomarcadores na identificação de implantes saudáveis, com mucosite peri-implantar e com peri-implantite concluiu, dentro das limitações, que as IL-1 β e as IL-6 podem ser usadas como auxiliares em conjunto com os parâmetros clínicos. Os autores verificaram um aumento significativo na IL-6 entre mucosite peri-implantar e peri-implantite, porém na IL-1 β esse aumento não foi tão evidente (Ghassib, Chen, Zhu, & Wang, 2019).

Outro potencial biomarcador que tem sido alvo de estudo é a MMP-8 que é sintetizada na maior parte nos granulócitos polimorfonucleares, pré-armazenados nos grânulos subcelulares específicos, sendo libertados em elevadas quantidades no local da inflamação (Kinney, Ramseier, & Giannobile, 2007).

As MMP apresentam diversas funções nos processos fisiológicos, nomeadamente na morfogénese, osteogénese, erupção de dentes e cicatrização, sendo influenciadas por inibidores endógenos, pelo que quando estas apresentam baixa atividade significa que estamos perante um tecido são (Baker, Edwards, & Murphy, 2002). Mais especificamente as collagenases intersticiais (MMP-1 e MMP-8) têm como função iniciar a destruição da matriz extracelular na doença periodontal. As atividades destas enzimas são controladas principalmente por inibidores teciduais de metaloproteinases (Aiba, Akeno, Kawane, Okamoto, & Horiuchi, 1996). A ocorrência da destruição do tecido conjuntivo, estimulado pela MMP-8 leva ao desenvolvimento das lesões peri-implantares. Sendo a MMP-8 a principal collagenase encontrada na presença de uma peri-implantite, havendo evidência para esta ser um potencial biomarcador (Janska, Mohr, & Wahl, 2015). A MMP-8 é muito eficaz no controlo da rapidez da destruição do tecido conjuntivo, sendo que existe um aumento ligeiro da MMP-8 nas primeiras duas semanas após a colocação

de implantes, porém a ocorrência desse aumento em fases posteriores, pode ser considerado um biomarcador para identificar o desenvolvimento de peri-implantite (Arakawa et al., 2012; Janska et al., 2015).

Quando se procura um novo biomarcador é importante avaliá-lo de forma a perceber se apresenta suficiente sensibilidade e especificidade para ser aplicado com utilidade para fins diagnósticos. A especificidade pode ser definida como a probabilidade de um indivíduo sem a doença ter um resultado negativo no teste e a sensibilidade é a probabilidade de um indivíduo com a doença ter um resultado positivo no teste (Leefflang, 2014). Todavia, a utilidade clínica de um teste não pode ser determinada apenas pela sensibilidade ou só pela especificidade exigindo a consideração de ambas as medidas de desempenho. Estima-se que ao se utilizar um teste com alta especificidade, um resultado positivo é eficaz na decisão de uma condição e que ao se utilizar um teste com alta sensibilidade, um resultado negativo seja eficaz para descartar uma condição. Porém, não adianta um teste ter alta especificidade e baixa sensibilidade ou o inverso, pois não acrescenta nada para determinar uma condição. Pelo que se torna importante um equilíbrio entre ambas as medidas, mesmo que por vezes não seja fácil (Kent & Hancock, 2016).

1.5.2.1. Fosfatase Alcalina (ALP)

Nas últimas décadas a fosfatase alcalina tem sido alvo de estudo em pacientes com distúrbios ósseos e hepáticos. É uma enzima que tem baixa especificidade de substrato, sendo que os substratos típicos da fosfatase alcalina humana incluem ésteres de fosfato de álcoois alifáticos primários e secundários. A ALP catalisa a hidrólise de vários ésteres de fosfato em pH alcalino. Esta enzima é encontrada em tecidos humanos nomeadamente nos ossos, intestinos, rins, fígado, placenta e glóbulos brancos (Kaplan, 1994).

A ALP é uma glicoproteína que se encontra ligada à membrana. Esta enzima, quando presente no fluído, é proveniente de leucócitos, osteoblastos, macrófagos e fibroblastos, podendo ainda ser produzida por bactérias que se encontram no sulco ou na bolsa periodontal. Os níveis de ALP mostraram ser úteis na deteção antecipada de alterações periodontais, avaliação do prognóstico e da eficácia do tratamento, uma vez que esta

enzima é encontrada nas membranas dos osteoblastos durante a formação e mineralização do osso (Gupta et al., 2018).

1.5.2.2. Aspartato Aminotransferase (AST)

A enzima citoplasmática aspartato aminotransferase encontra-se distribuída a nível hepático, esquelético e músculo cardíaco. A libertação extracelular desta enzima está relacionada com o dano e morte celular. Verificou-se que os níveis de AST estavam correlacionados de forma positiva com os parâmetros clínicos, nomeadamente a profundidade de sondagem, presença de hemorragia à sondagem e perda clínica de inserção em pacientes com doença periodontal (Gupta et al., 2018).

As doenças periodontais são compostas por duas entidades principais: gengivite e periodontite. Na periodontite existe destruição tecidual com consequente morte celular e perda de tecido periodontal, pelo que a AST pode ser utilizada como um marcador inespecífico para as mesmas. A elevada atividade desta enzima está associada à presença de agentes patogénicos periodontais, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermedia* (Oringer et al., 2001). Do mesmo modo, na peri-implantite onde também existe a ocorrência de destruição tecidual, um dos potenciais biomarcadores apontados é a atividade da AST presente no FCPI (Dursun & Tözüm, 2016).

1.6. Tratamento das Doenças Peri-implantares

O tratamento da doença peri-implantar pode ser não cirúrgico ou cirúrgico, dependendo da gravidade da mesma. O principal objetivo é descontaminar as superfícies do implante contaminado (Smeets et al., 2014).

Idealmente, num tratamento peri-implantar o objetivo seria acabar com a doença, ou seja, não existir supuração, hemorragia à sondagem, nem perda óssea, estabelecendo tecidos peri-implantares duros e moles saudáveis, e após isso proceder a uma manutenção periódica. Porém, caso isso seja impossível de se obter, um dos objetivos será a redução da inflamação clínica (redução da profundidade de sondagem peri-implantar e

hemorragia à sondagem) e o estabelecimento de um ambiente local propício ao controle do biofilme (Heitz-Mayfield & Mombelli, 2014).

Embora haja dificuldade em delinear recomendações específicas sobre a terapia cirúrgica ou não cirúrgica da peri-implantite há procedimentos que evidenciam ser vantajosos. Nomeadamente, numa fase antes do tratamento, o paciente deve ser instruído a realizar uma correta higiene oral, a cessar o hábito tabágico, caso utilize prótese realizar os devidos ajustes, caso necessário, avaliá-la em termos de facilidade de controlo de placa e realizar o desbridamento não cirúrgico com ou sem antimicrobianos. Caso não seja suficiente o tratamento não cirúrgico deve-se realizar um acesso cirúrgico através de um retalho de espessura total de forma a criar um acesso para a limpeza completa das superfícies contaminadas do implante e eventual regeneração dos defeitos ósseos existentes. É importante alertar para a necessidade de cuidados de manutenção em intervalos regulares (Heitz-Mayfield & Mombelli, 2014).

1.6.1. Tratamento da mucosite

Numa primeira fase o tratamento passa por instruções de higiene oral e tratamento não cirúrgico. Este último inclui a limpeza mecânica com curetas de titânio ou de plástico, ultra-som ou polimento com jato de glicina ou eritrol. A terapia antimicrobiana pode ter o auxílio da terapia fotodinâmica e da medicação antisséptica local nomeadamente com clorhexidina, peróxido de hidrogénio, iodo-povidona (Smeets et al., 2014).

1.6.2. Tratamento da peri-implantite

O tratamento da peri-implantite é similar ao tratamento de dentes com doença periodontal. A escolha do tratamento a ser aplicado irá depender da severidade da peri-implantite, avaliada através da profundidade de sondagem, hemorragia à sondagem e perda óssea radiográfica, como está resumido na tabela 3 (Lang et al., 2004).

Tabela 3: Protocolo de Terapia de Suporte Intercetiva Cumulativa (CIST), (adaptado de Lang et al., 2004)

| Estágio | Características | Tratamento |
|----------------|--|---|
| | PS < 3 mm sem placa bacteriana ou HS | Sem tratamento |
| A | PS < 3 mm com placa bacteriana e/ou HS | Desbridamento manual e polimento |
| B | PS 4-5 mm, sem perda óssea radiográfica PS > 5mm sem perda óssea radiográfica | Desbridamento manual, polimento e aplicação de antissépticos (por ex. clorhexidina a 0,1% a 0,2%) |
| C | PS > 5mm com perda óssea radiográfica < 2 mm | Terapia antibiótica local/sistêmica |
| D | PS > 5mm com perda óssea radiográfica > 2 mm | Cirurgia ressectiva ou regenerativa |

PS= profundidade de sondagem. HS=Hemorragia á sondagem.

Os pacientes após realizarem uma reabilitação implanto-suportada devem receber instruções sobre a sua manutenção, assim como a monitorização sistemática e contínua do estado de saúde dos tecidos peri-implantares, de forma a detetar e intervir precocemente caso exista algum problema. Nestas consultas devem ser avaliados os seguintes parâmetros: presença de placa microbiana e de tártaro, PS e HS peri-implantar, supuração e caso seja indicado a avaliação radiográfica. Após o diagnóstico, deve-se utilizar a Terapia de Suporte Intercetiva Cumulativa. Esta inclui quatro estágios: A=desbridamento mecânico, B=tratamento antisséptico, C=tratamento antibiótico e D=cirurgia ressectiva ou regenerativa (Lang, et al., 2004).

Atualmente o diagnóstico da peri-implantite é feito com base no exame clínico e radiográfico, no entanto existem diversas limitações como a dificuldade em distinguir o grau de atividade da doença, risco de progressão futura e avaliação da resposta ao tratamento. De forma a superar estas limitações poderá ser vantajosa a utilização de biomarcadores que permitam detetar estas alterações de modo preciso e atempado.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da fosfatase alcalina e da aspartato aminotransferase como biomarcadores para o diagnóstico precoce da peri-implantite.

II. HIPÓTESES

Foram estabelecidas duas hipóteses:

Hipótese nula (H_0) = Não existe um aumento da atividade da fosfatase alcalina e da aspartato aminotransferase em pacientes com peri-implantite.

Hipótese alternativa (H_1) = Existe um aumento da atividade da fosfatase alcalina e da aspartato aminotransferase em pacientes com implantes com peri-implantite.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Considerações éticas

Este estudo foi conduzido conforme os princípios da declaração de Helsínquia e foi submetido à Comissão de Ética da Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz (processo nº 705), tendo sido aprovado.

Os participantes do estudo foram informados e esclarecidos sobre a metodologia e objetivos do mesmo e assinaram o Termo de Consentimento Informado (anexo I). Os dados foram utilizados exclusivamente para análise estatística, mantendo-se a confidencialidade e o anonimato.

3.2. Tipo de estudo

Estudo experimental.

3.3. Local de estudo

O estudo decorreu na clínica dentária Egas Moniz e nos laboratórios do Instituto Universitário Egas Moniz, no Monte da Caparica.

3.4. Amostra

3.4.1. Seleção da amostra

O estudo decorreu entre março e julho de 2019. Foram selecionados pacientes da Clínica Universitária Egas Moniz que cumpriam os critérios de inclusão e assinaram o consentimento informado. Em casos, em que o paciente apresentava mais que um implante, foi realizada a recolha no implante com a bolsa com maior profundidade de sondagem.

A seleção dos pacientes com peri-implantite foi de acordo com os critérios definidos por Berglundh et al. (2018) e a dos pacientes com doença periodontal foi de acordo com os critérios definidos por Tonetti, Greenwell, & Kornman (2018).

3.4.2. Critérios de inclusão

Incluíram-se no estudo pacientes:

- Com idade entre 18 e 65 anos;
- Que nunca realizaram tratamento periodontal ou peri-implantar;
- Com pelo menos um implante osseointegrado;
- Com implantes colocados há pelo menos dois anos e em função há pelo menos um ano.

3.4.3. Critérios de exclusão

Neste estudo excluíram-se pacientes que:

- Apresentavam doenças sistêmicas tais como diabetes mellitus ou patologias hepáticas ou ósseas;
- Fizeram antibioterapia ou tomaram corticosteroides há menos 30 dias;
- Estavam grávidas ou a amamentar;
- Eram fumadores;
- Estavam em tratamento ortodôntico.

3.5. Materiais

3.5.1. Para observação do paciente e recolha da amostra

- *Kit* básico (espelho, pinça e sonda);
- Luvas e máscaras individuais de proteção;
- Sonda periodontal CP-12 (Hu-Friedy®, Chicago, IL, USA)
- Rolos de algodão;
- Bolinhas de algodão esterilizadas;
- *Sani-tips* descartáveis;

- Pontas de papel nº40 (Bestdent);
- Tubos *Eppendorfs* de 1,5 ml;
- Régua oclusal, 3M;
- Paralelizador (X-Ray Holders, Kerr);
- Películas de radiografias peri-apicais (Dental X-ray Film, Henry Schein);

3.5.2. Para determinação das atividades enzimáticas

- Balança Analítica, Precisa 125 A;
- Microplate reader AMP Platos R496;
- Centrifuga de bancada Eppendorf centrifuge 5418;
- Mini Vortexer da VWR;
- IPS sanofi diagnostics pasteur;
- 4-Nitrofenilfosfato de di-sódio hexahidratado da VWR Chemicals;
- 2-amino-2-methyl-1-propanol, Sigma-Aldrich;
- 4-Nitrophenol, Fluka;
- Microplaca;
- Micropipeta de 10, Biopette autoclavable;
- Micropipeta de 100, Gilson VWN;
- Micropipeta de 1000, Biopette autoclavable;
- Micropipeta Multicanal Biohit proline;
- Pipetedor automático Fastpette V-2;
- Tubos de centrífuga de 15 mL;
- Espátula de inox;
- Aminotranferase (AST), Activity Assay *Kit* (Sigma- Aldrich).

3.5.3. SDP-PAGE

- Sistema electroforese, Mini-protean II (Bio-Rad);
- Fonte de tensão, Power pac 300 (Bio-Rad);
- Agitador orbital;
- Acetone 3, II (VWR);

- Accublock digital dry bath, (Labnet);
- Padrões de massa molecular, Precision plus protein standards unstained (Bio-Rad);
- Solução corante, Coomassie brilliant blue de-staining solution (Bio-Rad);
- Trichloroacetic Acid (BP, Ph. Eur.) pure, pharma grade, Panreac;
- 12% mini-protein TGX precast Gels (Bio-Rad);
- Solução descolorante (Bio-Rad);
- Tampão de corrida (10x; 0,25 M Tris-HCl, pH 8,3; 1,92 M glicina; 1% (p/v) SDS);
- Tampão de amostra (4x; 0,2% M Tris-HCl, pH 6,8; 20% (v/v) glicerol; 8% (p/v) SDS; 5% (v/v) β-mercaptoetanol; 0,02% (p/v) azul bromofenol.

3.6. Protocolo Clínico

Após selecionar o participante segundo os critérios de inclusão e exclusão procedeu-se à explicação dos objetivos do estudo e do procedimento a efetuar e solicitou-se a assinatura do consentimento informado.

3.6.1. Avaliação da higiene Oral

Foi realizada a avaliação da higiene oral através da medição dos índices de placa (IP) e do índice gengival (IG) utilizando uma sonda periodontal graduada.

3.6.2. Recolha da amostra

Para recolher a amostra de fluído crevicular procedeu-se ao isolamento relativo da zona do implante onde se iria realizar a recolha com rolos de algodão. Com bolas de algodão secas e esterilizadas removeu-se a placa bacteriana supragengival. De seguida, secou-se a zona com um jato de ar suave durante 10 segundos. Inseriu-se com uma pinça um cone de papel esterilizado e pré-pesado, na localização de maior profundidade até se sentir uma ligeira resistência e aguardou-se 30 segundos (Figura 4), removendo-se de seguida o cone que foi colocado no tubo *Eppendorf*.



Figura 4: Recolha do FCPI com um cone de papel esterilizado (cortesia do Professor Ricardo Alves).

No implante onde se realizou a recolha foi medida a profundidade de sondagem, recessão e avaliada a presença de hemorragia à sondagem e/ou supuração. Foram desprezadas as amostras que continham sangue visível a olho nu. Realizou-se um raio X peri-apical com um paralelizador e avaliou-se a perda óssea, medindo com uma régua desde a plataforma do implante ao topo da crista óssea. Foi considerada a zona com maior perda (Figura 5).

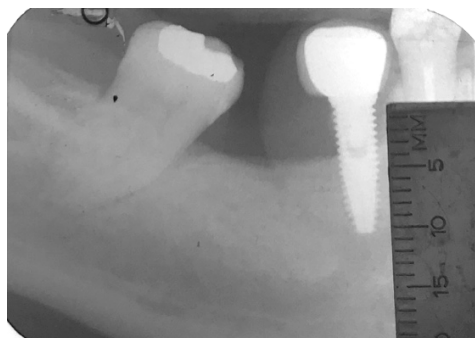


Figura 5: Medição da perda óssea numa radiografia peri-apical.

As amostras foram encaminhadas de imediato para o laboratório onde os tubos *Eppendorf* contendo os cones de papel foram de novo pesados numa balança analítica para determinação, por diferença, do volume recolhido. De seguida, foi adicionado 100 μ l de tampão PBS a cada amostra que foi posteriormente congelada (-20°C).

3.7. Estudo Laboratorial

Preparação das amostras: as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente durante 30 min, e posteriormente colocadas no vortex durante 1 min sendo em seguida centrifugadas durante 60 segundos.

3.7.1. Análise da Fosfatase Alcalina

A atividade da ALP foi determinada, em triplicado, em tampão 900 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) pH 10,3 por espectrofotometria, utilizando como substrato 9 mM de p-nitrofenilfosfato (pNPP). A reação foi iniciada por adição de 100 µl de substrato a 100 µl de tampão AMP contendo 5 ou 10 µl da amostra, e decorreu a 37°C durante 1 hora. A liberação do produto p-nitrofenolato foi determinada pela absorvância medida ao comprimento de onda de 405 nm usando uma curva de calibração. Para a curva de calibração foi usado 0, 0,5, 1, 2, 5, 10 nmol de p-nitrofenol em tampão AMP (anexo II).

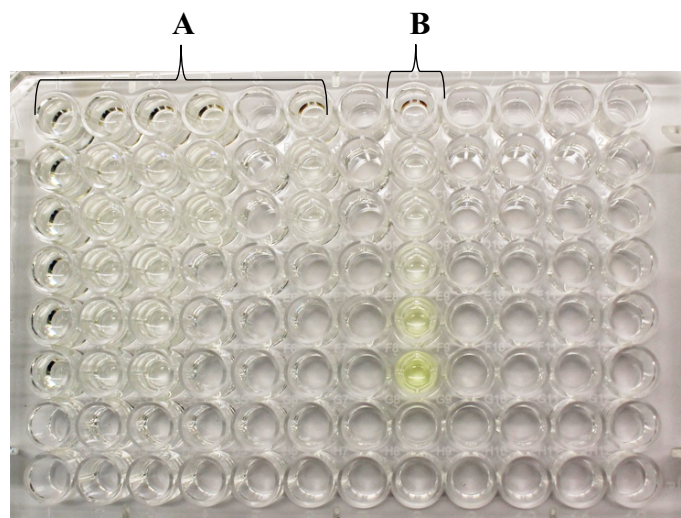


Figura 6: Análise da atividade da Fosfatase Alcalina (ALP): **A)** amostras e **B)** curva de calibração.

3.7.2. Análise da Aspartato Aminotransferase

A atividade da AST foi determinada, em duplicado, usando um *kit* comercial para a detecção da sua atividade, seguindo as instruções do fabricante. Curva de calibração em anexo (anexo III).

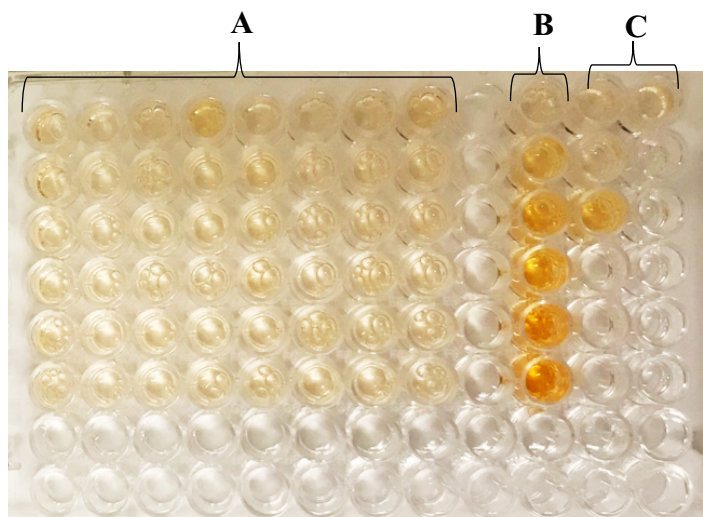


Figura 7: Análise da atividade da Aspartato Aminotransferase (AST), Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich): **A)** amostra, **B)** curva de calibração e **C)** amostras de controlo.

3.7.3. SDS-PAGE

As amostras de cada grupo foram reunidas num *Eppendorf* para serem analisadas no seu todo. Após homogeneizadas no vortex durante 1 min foram centrifugadas durante 60 segundos. As proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a -20°C durante 2 min, de seguida, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se a acetona e levou-se ao vortex durante 5min, repetindo-se este último procedimento duas vezes para remoção total do ácido. As proteínas foram de novo dissolvidas em PBS.

Para a quantificação proteica foi usado o *kit* Pierce™ BCA Protein Assay segundo as indicações do fabricante. As amostras foram diluídas para 1,5 mg/ml em tampão de amostra, incubadas por 3 min a 100°C , e arrefecidas em gelo antes de serem colocadas no gel. Foi realizada a montagem da tina de eletroforese, posteriormente foi preenchida com o tampão de corrida. As amostras foram colocadas nos poços do gel, com o auxílio de uma micropipeta, assim como o marcador dos padrões de massa molecular (em cada extremidade).

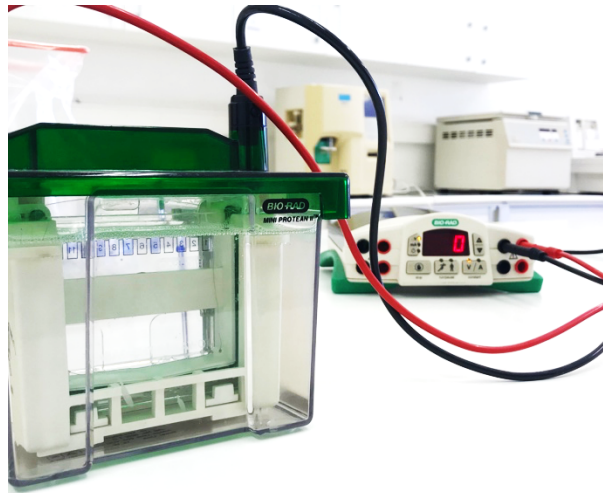


Figura 8: Equipamento de eletroforese com as amostras aplicadas no gel.

A eletroforese foi realizada a uma tensão constante de 100 V. O gel foi incubado em solução corante de azul de Coomassie R-250 no agitador orbital durante 3 horas. Foi substituída a solução corante por uma solução descorante. As massas moleculares das bandas de interesse foram determinadas usando uma curva de calibração realizada com as bandas do marcador (anexo IV).

3.8. Análise Estatística

Os dados clínicos e laboratoriais foram introduzidos numa base de dados criada no programa Microsoft Excel® 2017 (Microsoft, Seattle, USA). A análise estatística foi efetuada no programa IBM SPSS (Statistical Package of the Social Sciences versão 24.0, Armonk, NY: IBM Corp.). Foram realizados os testes de normalidade e segundo o teste Shapiro-Wilks e como as amostras eram em número reduzido não se verificou a mesma, pelo que se recorreu aos testes não paramétricos de amostras independentes.

IV. RESULTADOS

4.1. Caracterização da amostra

Dos 43 pacientes inicialmente convidados a participar no estudo foram excluídos seis por apresentarem diabetes mellitus, três por serem fumadores e dois por já terem realizado tratamento periodontal. Posteriormente, dez amostras foram excluídas por terem volume de FCPI $< 0,5 \mu\text{l}$. Sendo assim, a amostra final foi de 22 pacientes, sendo dez do género masculino e doze do género feminino com uma média de idades de 57 ± 12 anos e com implantes em função, em média, há 8 ± 5 anos.

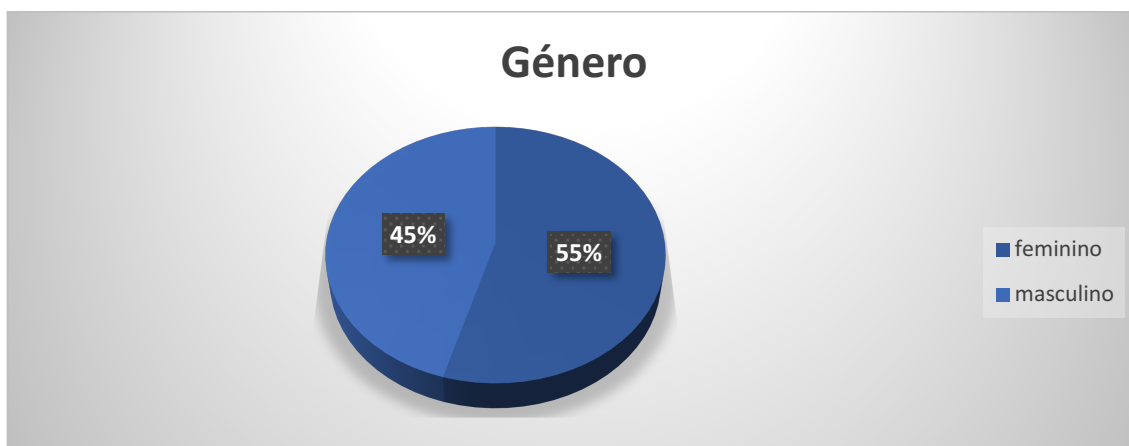


Gráfico 1: Distribuição dos pacientes por género na amostra estudada.

Os pacientes foram divididos em quatro grupos de acordo com o diagnóstico clínico:

- Grupo 1 (controlo): com saúde peri-implantar e com saúde periodontal (n=5);
- Grupo 2: com doença peri-implantar e com saúde periodontal (n=7);
- Grupo 3: com doença peri-implantar e com doença periodontal (n=7);
- Grupo 4: com saúde peri-implantar e com doença periodontal (n=3);

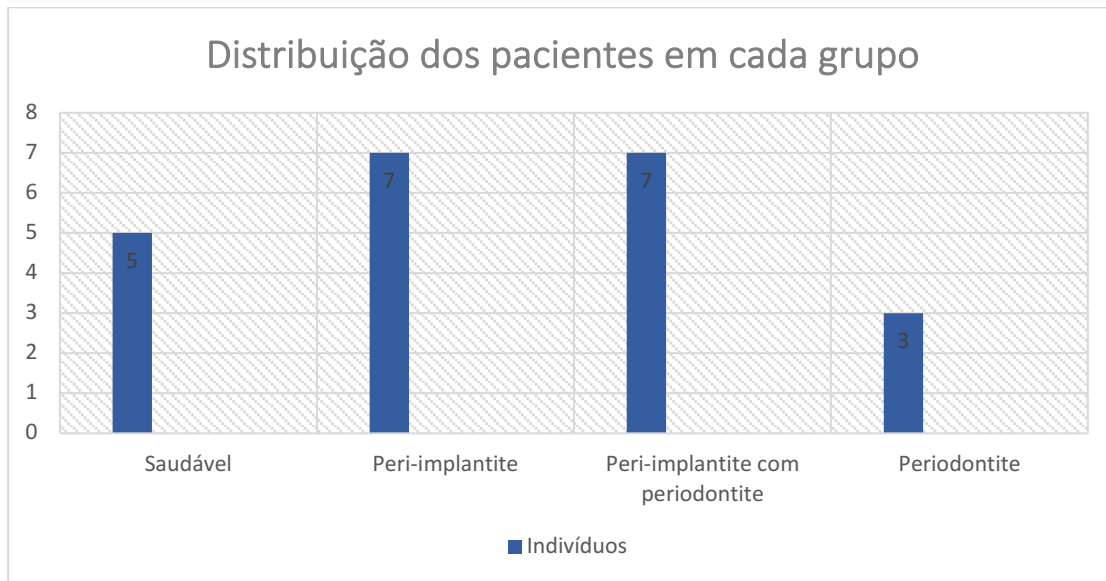


Gráfico 2: Distribuição dos participantes de acordo com o diagnóstico.

O grupo 1, incluiu cinco indivíduos do género feminino com uma média de idades de 49 ± 21 anos. Nestes pacientes os implantes em carga foram postos em média há 14 ± 5 anos.

O grupo 2, incluiu quatro indivíduos do género feminino e três do género masculino com uma média de idades de 62 ± 5 anos, sendo que nestes pacientes os implantes em carga foram postos em média há 6 ± 3 anos.

O grupo 3, incluiu dois indivíduos do género feminino e cinco do género masculino com uma média de idades de 60 ± 6 anos e nestes pacientes os implantes com carga foram postos em média há 9 ± 5 anos.

O grupo 4, incluiu um indivíduo do género feminino e dois do género masculino com uma média de idades de 57 ± 13 anos e nestes pacientes os implantes em carga foram postos em média há 4 ± 2 anos.

Os grupos 2 e 3 (peri-implantite) foram subdivididos conforme o grau de perda de inserção em: leve, moderada e severa (Gráfico 3 e 4).

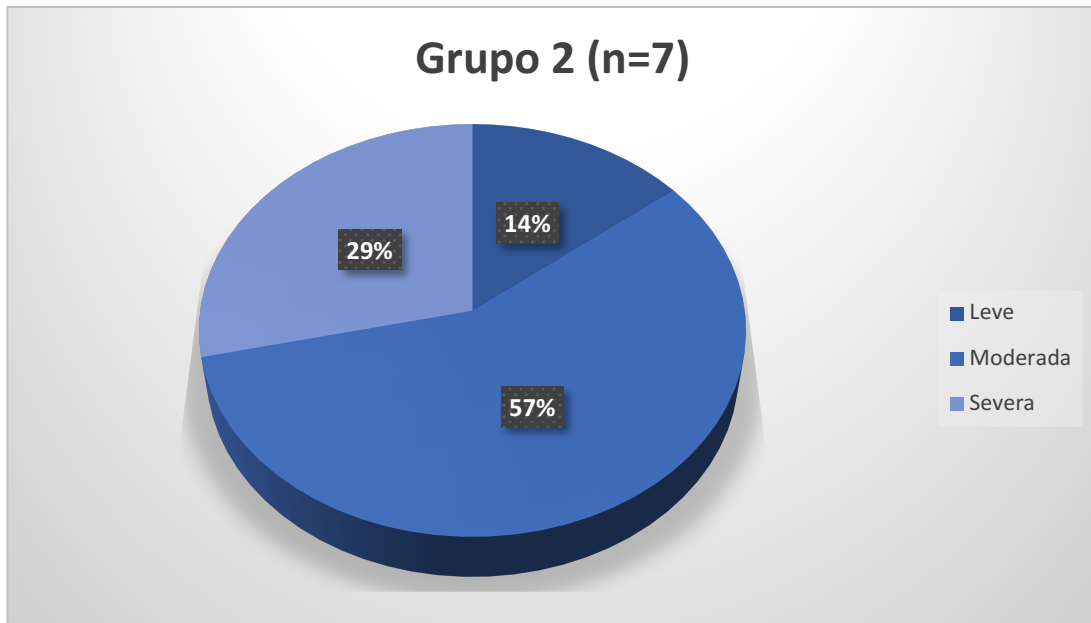


Gráfico 3: Frequência da severidade da peri-implantite no grupo 2: leve (n=1), moderada (n=4) e severa (n=2).

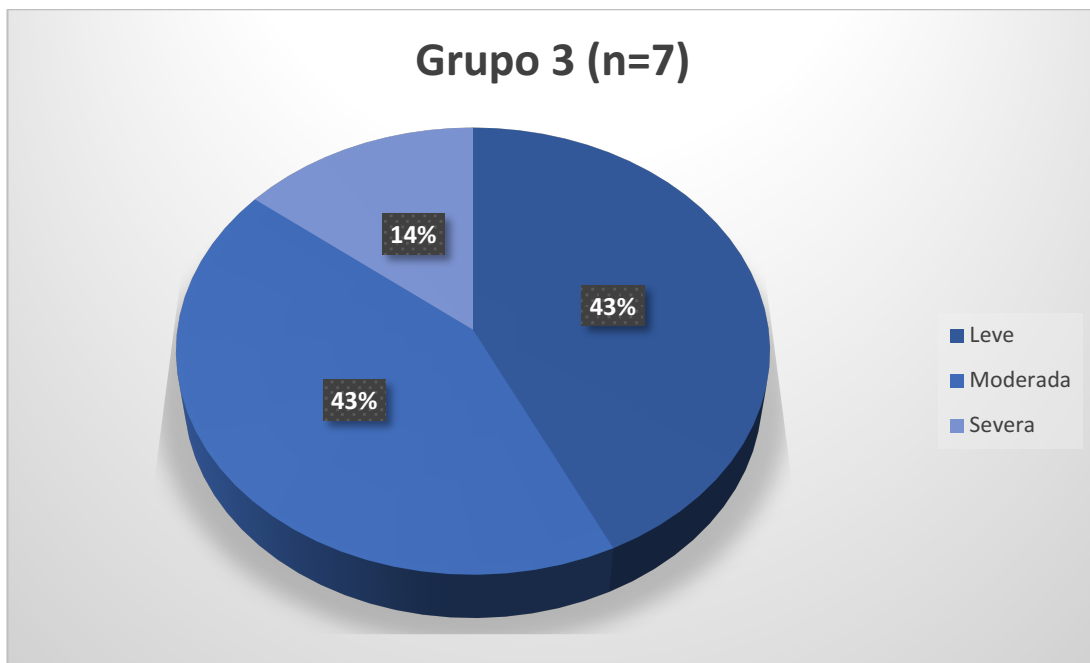


Gráfico 4: Frequência da severidade da peri-implantite no grupo 3: leve (n=3), moderada (n=3) e severa (n=1).

4.2. Comparação da atividade da ALP nos três grupos

Após realizar a análise da atividade enzimática da ALP no líquido crevicular dos três grupos, verificou-se uma maior atividade enzimática no grupo com doença peri-implantar e com doença periodontal ($0,089 \pm 0,02$ U/ml), seguida dos indivíduos com doença peri-implantar e com saúde periodontal ($0,062 \pm 0,04$ U/ml), e com valores mais baixos no grupo com saúde peri-implantar e com saúde periodontal ($0,021 \pm 0,02$ U/ml), (ver Gráfico 3). No entanto, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos ($p=0,075$, teste de Kruskal-Wallis).

Tabela 4: Resultados da atividade da ALP nos três grupos. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

| | ALP (U/ml) | p | Valor Máx. (U/ml) | Valor Mín. (U/ml) |
|----------------|------------------|-------|-------------------|-------------------|
| Grupo 1 | $0,021 \pm 0,02$ | 0,075 | 0,127 | 0,001 |
| Grupo 2 | $0,062 \pm 0,04$ | | | |
| Grupo 3 | $0,089 \pm 0,02$ | | | |

Amostras Independentes de Teste de Kruskal-Wallis

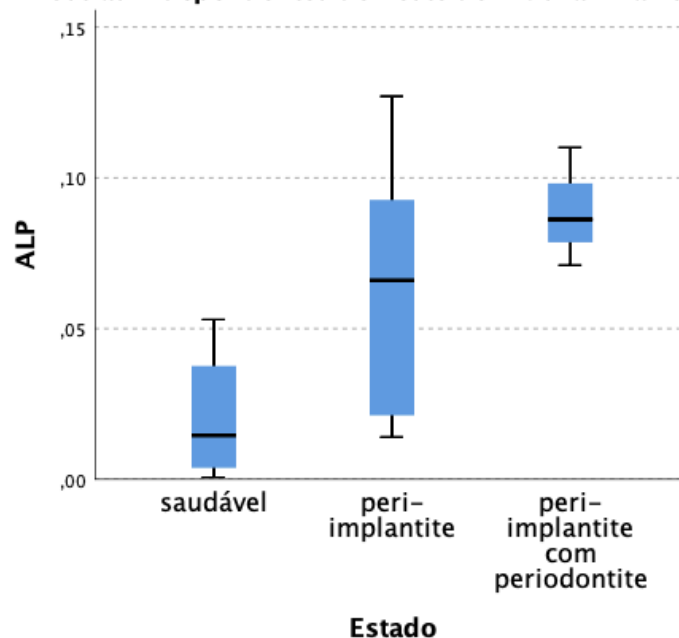


Gráfico 5: Atividade enzimática da ALP em função do estado de saúde peri-implantar. O gráfico revela os quartis inferior e superior e a mediana (caixa azul). Os valores adjacentes marcam os menores e os maiores valores não declarados como *outliers*.

4.3. Comparação da atividade da AST nos três grupos

Na análise da atividade enzimática da aspartato aminotransferase no líquido crevicular observou-se uma maior atividade da AST no grupo com doença peri-implantar e com doença periodontal ($1,79 \pm 0,7$ U/ml), seguida do grupo com doença peri-implantar e com saúde periodontal ($1,05 \pm 1,5$ U/ml), e por fim nos pacientes com saúde peri-implantar e saúde periodontal ($0,45 \pm 0,3$ U/ml), (ver Gráfico 4). Não se observam diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos. ($p=0,167$, teste de Kruskal-Wallis).

Tabela 5: Resultados da atividade da AST nos três grupos. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

| | AST (U/ml) | p | Valor Máx. (U/ml) | Valor Mín. (U/ml) |
|----------------|----------------|-------|-------------------|-------------------|
| Grupo 1 | $0,45 \pm 0,3$ | 0,167 | 2,73 | 0,160 |
| Grupo 2 | $1,05 \pm 1,5$ | | | |
| Grupo 3 | $1,79 \pm 0,7$ | | | |

Amostras Independentes de Teste de Kruskal-Wallis

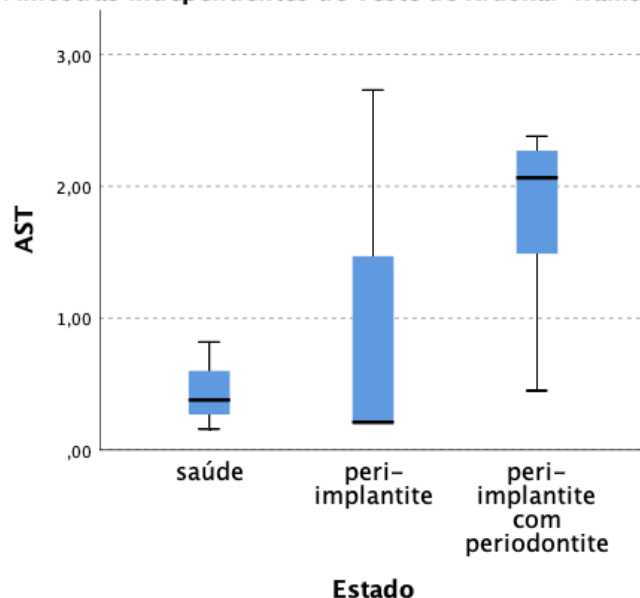


Gráfico 6: Atividade enzimática da AST em função do estado de saúde peri-implantar. O gráfico revela os quartis inferior e superior e a mediana (caixa azul). Os valores adjacentes marcam os menores e os maiores valores não declarados como *outliers*.

4.4. Análise das proteínas totais do fluido crevicular por SDP-PAGE

Tendo como último objetivo a identificação de um marcador para a peri-implantite, e na posse de amostras de fluidos de diferentes condições, optamos por em adição à determinação das atividade das enzimas analisar o perfil das proteínas totais presentes. Nesta análise foram utilizados os quatro grupos de pacientes com implantes saudáveis sem e com doença periodontal, implantes com peri-implantite sem e com doença periodontal. Para esta análise foram reunidas as amostras de FCPI de todos os participantes de cada grupo para tentar evidenciar alguma alteração característica da condição de saúde. Verificou-se nos pacientes saudáveis seis bandas com massas moleculares: 70kDa, 60 kDa, 49 kDa, 25 kDa, 12 kDa e 11kDa, sendo que estas também foram visíveis nos outros grupos (Figura 9).

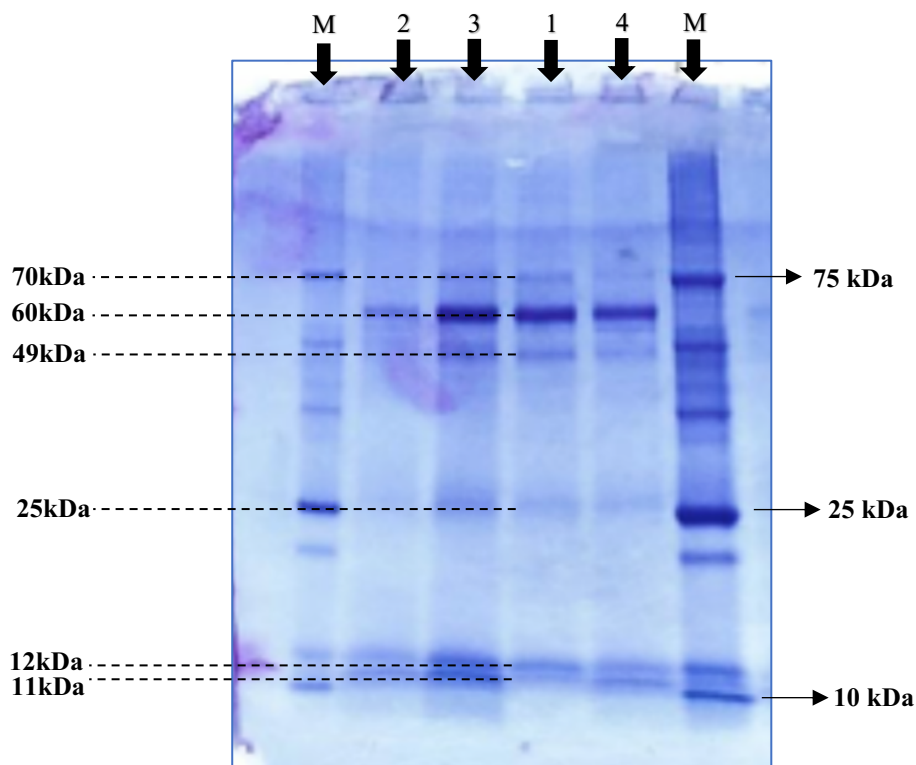


Figura 9: Análise por SDP-PAGE (12%) das proteínas totais do fluido crevicular de implantes saudáveis (1), com peri-implantite e com periodonto saudável (2), com peri-implantite e com doença periodontal (3) e implantes saudáveis com doença periodontal (4). Marcador de massas moleculares (M). A seta indica a massa molecular de proteína do marcador e a linha a tracejado a massa molecular calculada de proteínas comuns nas quatro amostras

Ao realizar uma comparação entre as bandas dos pacientes saudáveis e os outros grupos há três notas a referir. i) Observa-se que nos pacientes com o implante saudável e com doença periodontal e nos pacientes com peri-implantite e com o periodonto saudável

uma banda adicional abaixo da banda de 60 kDa com massa aproximada de 55kDa, e no grupo dos pacientes com peri-implantite e com doença periodontal uma banda adicional ligeiramente superior a 49 kDa que não é evidente nas outras duas condições; ii) A amostra dos pacientes com peri-implantite e com o periodonto saudável aparenta a banda de 60 kDa com menor intensidade que nos outros grupos; iii) Nas amostras dos pacientes com peri-implantite com e sem doença periodontal assim como no grupo dos pacientes com o implante saudável mas com doença periodontal verificou-se que a banda de 11 kDa é mais intensa que no grupo dos pacientes saudáveis.

V. DISCUSSÃO

A doença peri-implantar é diagnosticada recorrendo à avaliação clínica e radiográfica, no entanto estas apresentam algumas limitações. Por exemplo, na avaliação clínica é avaliada a profundidade de sondagem, no entanto, esta pode ser afetada por vários fatores nomeadamente: variações na força de sondagem, o diâmetro da sonda, mau posicionamento da sonda, erro na leitura, estado de saúde dos tecidos moles, forma do implante e existência de depósitos subgengivais (Cha, Wadhvani, Wang, Hokett, & Katancik, 2019). A avaliação clínica e radiográfica também não é eficiente na avaliação da progressão da doença e no seu estado de atividade, avaliando apenas a gravidade da destruição já ocorrida (Berglundh et al., 2018). Assim torna-se importante desenvolver um teste, como por exemplo biomarcadores, que permitam um diagnóstico precoce, preciso e rigoroso antes de ocorrer a perda óssea irreversível, mas também avaliar a resposta ao tratamento no caso de esta já ter ocorrido.

Existe um risco aumentado para o desenvolvimento da peri-implantite em pacientes com antecedentes de periodontite, mau controle de placa bacteriana e ausência de manutenção regular após a colocação dos implantes a diabetes e o tabagismo também têm sido identificados como potenciais indicadores de risco da peri-implantite (Berglundh et al., 2018). Neste estudo, uma das grandes dificuldades foi recrutar pacientes apenas com peri-implantite e sem doença periodontal, pois a maioria dos pacientes com peri-implantite também tinham periodontite, provavelmente devido à associação entre ambas as patologias. Todavia, para que o estudo abranja o maior número de pacientes possível, foi incluído um grupo com doença peri-implantar e com doença periodontal.

O FCPI é um exsudado com diversos constituintes que são apontados como potenciais biomarcadores da doença peri-implantar e têm sido alvo de inúmeros estudos. A análise dos seus componentes pode dar informações importantes sobre a doença peri-implantar (Zani et al., 2016). Este estudo procurou avaliar se a atividade enzimática da ALP e da AST no FCPI poderia ser utilizada como biomarcador da peri-implantite. Vários estudos têm relacionado estas enzimas à periodontite, observando-se um aumento das mesmas nos pacientes com periodontite em comparação aos pacientes com o periodonto saudável (Caúla, Lira-Junior, Tinoco, & Fischer, 2015). No entanto, no âmbito da peri-implantite

ainda são poucos os estudos sobre estas enzimas no FCPI na monitorização da saúde e da doença peri-implantar.

De forma a tentar esclarecer a relação destas enzimas na peri-implante foi realizado um estudo experimental em que foi efetuada a análise da atividade enzimática da ALP e da AST como potenciais biomarcadores enzimáticos da peri-implantite em três grupos de pacientes com condições clínicas bem definidas: saudáveis, com peri-implantite com e sem doença periodontal.

A atividade enzimática da ALP aparenta ser maior no grupo dos pacientes com peri-implantite e periodontite, seguido do grupo com peri-implantite com saúde periodontal e por último, com valores mais baixos, pacientes com implantes saudáveis, embora não se tenham verificado diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos. Estes resultados vão de encontro aos de um estudo semelhante realizado por Paknejad, Emtiaz, Khoobyari, Gharb, & Yazdi (2006) onde foram comparados implantes sem e com peri-implantite e se verificou um aumento da atividade da ALP nestes últimos, porém não se encontraram correlações estatísticas entre os índices de placa e hemorragia e os níveis de ALP.

Os resultados parecem indicar, que a atividade enzimática da ALP entre os pacientes com peri-implantite e com doença periodontal é maior em comparação aos pacientes com peri-implantite e com o periodonto saudável. Isto pode ser explicado pelo facto de os pacientes com doença periodontal terem maior quantidade de tecido envolvido, sendo maior a magnitude da destruição do tecido. Por outro lado, ainda que a recolha tenha sido realizada no sulco peri-implantar pode existir um aumento da inflamação provocada pelos dentes adjacentes.

A AST é uma enzima intracelular confinada ao citoplasma celular que é libertada quando ocorre morte celular. Neste estudo, nos resultados da atividade da AST verificou-se, como esperado, um aumento nos dois grupos com peri-implantite relativamente ao controlo, apesar de não se terem verificado diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos. Estes resultados, estão de acordo com um estudo semelhante realizado por Paolantonio et al. (2000) que verificou uma maior atividade da AST no FCPI de pacientes com peri-implantite em comparação com pacientes saudáveis e com mucosite. Paknejad

et al. (2006), observaram um aumento da atividade de AST em torno de implantes com hemorragia à sondagem e aumento da PS.

Em ambas as determinações, ALP e AST, se observou uma elevada dispersão dos resultados para as amostras com peri-implantite. Isto pode dever-se ao facto dos pacientes com peri-implantite apresentarem diferenças na severidade (ver Gráfico 3 e 4) ou no estado de atividade da peri-implantite. O facto de haver poucas amostras de pacientes apenas com peri-implantite levou a que não fosse possível a análise de acordo com o grau de severidades, não tendo havido distinção entre as mesmas, sendo esta uma das limitações deste estudo. Este foi um estudo piloto onde no global foi analisado um número reduzido de amostras. Uma outra limitação foi o facto de apenas ter sido possível recolher um volume reduzido de FCPI. O reduzido volume recolhido dificultou os procedimentos laboratoriais e aumentou o erro associado às determinações. No futuro, esta questão poderá ser ultrapassada aumentando o tempo de recolha, realizando esta recolha em várias localizações do implante, ao invés de apenas na localização mais profunda e juntando-as de forma a obter um maior volume de amostra. Também poderia ser considerada a utilização de outro método de recolha como por exemplo com micropipetas ou tiras de papel absorvente que têm maior área de absorção que os cones (Attar et al., 2018).

Na análise das proteínas totais do fluído crevicular nos pacientes saudáveis observa-se um padrão de bandas semelhante ao do estudo realizado por Balducci et al. (2007) que traduzem a abundância de proteínas normalmente presente neste fluído. Muito interessante é a comparação desse padrão com o das amostras de pacientes com doença (peri-implantite e/ou periodontite) que faz sobressair a banda de 11kDa como principal diferença. No grupo dos pacientes com implantes saudáveis é menos intensa, ou seja, com menos concentração de proteínas com essa massa molecular, em comparação aos outros grupos. No entanto, não parece ser específica de peri-implantite. Uma outra observação curiosa é que, em comparação com os restantes grupos de pacientes, o grupo com peri-implantite e com saúde periodontal apresenta a banda do 60 kDa de muito menor intensidade, mas mantendo as bandas de 11 e 12kDa de intensidade semelhante aos outros grupos. A identificação destas proteínas poderão trazer novos dados que contribuam para a melhoria do diagnóstico precoce com base em marcadores específicos da saúde peri-implantar. Também com potencial discriminatório surge a banda adicional com cerca de 55kDa, massa molecular semelhante à da ALP “P05186 (PPBT_HUMAN)” (2019) com

57 kDa mas também à da MMP8, uma proteína com 53kDa “P22894 (MMP8_HUMAN)” (2019) já referida em vários estudos como potencial biomarcador da periodontite e da peri-implantite (Al-Majid et al., 2018). Alguns estudos verificaram que a MMP-8 na saliva tinha maior sensibilidade, podendo ser vantajosa na triagem, e que no fluido crevicular tinha maior especificidade, pelo que estes níveis poderão avaliar o sucesso do tratamento assim como permitir realizar uma personalização do tratamento necessário a cada indivíduo. A combinação de outros biomarcadores com a MMP-8 na deteção da inflamação periodontal/peri-implantar pode aumentar a precisão do diagnóstico.(Al-Majid et al., 2018).

Ao longo dos anos tem-se vindo a estudar vários biomarcadores para a peri-implantite, no entanto, ainda não foi encontrado um que fosse suficientemente sensível e específico, que nos permitisse realizar um diagnóstico rigoroso e preciso da peri-implantite. O facto de ainda não se ter encontrado esse biomarcador pode dever-se a vários fatores. Provavelmente poderá ser necessário a utilização de vários biomarcadores em conjunto de forma a proporcionarem um diagnóstico fiel com reduzida margem de erro. Seria clinicamente vantajoso que fosse possível criar com esse marcador um teste rápido, cujo resultado fosse um valor que nos especificasse a condição peri-implantar. Neste aspeto a ALP e AST seriam muito interessantes pois a sua atividade é relativamente fácil de determinação. É necessário continuar a estudar este tema de forma a contornar as limitações existentes, nomeadamente aumentando o número de pacientes e o volume das amostras de FCPI.

VI. CONCLUSÃO

Neste estudo foi testada a atividade de duas enzimas em condições de implantes saudáveis e com doença. Os resultados apontam para um ligeiro aumento, embora sem significância estatística, da atividade da fosfatase alcalina e da aspartato aminotransferase no líquido crevicular de implantes com doença peri-implantar. As pequenas diferenças observadas e a grande variabilidade nos valores podem ter resultado da dificuldade em recolher um maior volume de FCPI mas também do pequeno tamanho da amostra que inviabilizou a avaliação das amostras por grau de severidade da doença. Ainda assim, estes resultados sugerem que estas enzimas poderão ser úteis como biomarcadores da peri-implantite. O perfil de proteínas totais revelou-se muito informativo. Entre as proteínas totais do líquido crevicular surge, aparentemente, uma proteína de peso molecular 11 kDa em menor quantidade no grupo dos pacientes saudáveis em comparação aos outros grupos assim como uma proteína adicional de 55kDa, pelo que estas poderão ser exploradas como possíveis biomarcadores da saúde peri-implantar.

VII. BIBLIOGRAFIA

Aiba, T., Akeno, N., Kawane, T., Okamoto, H., & Horiuchi, N. (1996). Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. *European Journal of Oral Sciences*, 104(5–6), 562–569. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1996.tb00142.x>

Al-Majid, A., Alassiri, S., Rathnayake, N., Tervahartiala, T., Gieselmann, D.-R., & Sorsa, T. (2018). Matrix Metalloproteinase-8 as an Inflammatory and Prevention Biomarker in Periodontal and Peri-Implant Diseases. *International Journal of Dentistry*, 2018, 1–27. <https://doi.org/10.1155/2018/7891323>

Albrektsson, T., Canullo, L., Cochran, D., & De Bruyn, H. (2016). “Peri-Implantitis”: A Complication of a Foreign Body or a Man-Made “Disease”. Facts and Fiction. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 18(4), 840–849. <https://doi.org/10.1111/cid.12427>

Arakawa, H., Uehara, J., Hara, E. S., Sonoyama, W., Kimura, A., Kanyama, M., ... Kuboki, T. (2012). Matrix metalloproteinase-8 is the major potential collagenase in active peri-implantitis. *Journal of Prosthodontic Research*, 56(4), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2012.07.002>

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

Baker, A. H., Edwards, D. R., & Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science*, 115(19), 3719–3727. <https://doi.org/10.1242/jcs.00063>

Balducci, L., Ramachandran, A., Hao, J., Narayanan, K., Evans, C., & George, A. (2007). Biological markers for evaluation of root resorption. *Archives of Oral Biology*, 52(3), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.08.018>

Berglundh, T., Armitage, G., Araujo, M. G., Avila-Ortiz, G., Blanco, J., Camargo, P. M., ... Zitzmann, N. (2018). Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89(March), S313–S318. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0739>

Bohner, L. O. L., Mukai, E., Oderich, E., Porporatti, A. L., Pacheco-Pereira, C., Tortamano, P., & De Luca Canto, G. (2017). Comparative analysis of imaging techniques for diagnostic accuracy of peri-implant bone defects: a meta-analysis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 124(4), 432-440.e5. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.06.119>

Caúla, A. L., Lira-Junior, R., Tinoco, E. M. B., & Fischer, R. G. (2015). Serum creatinine and alkaline phosphatase levels are associated with severe chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 50(6), 793–797. <https://doi.org/10.1111/jre.12266>

Cha, J., Wadhvani, C., Wang, M., Hokett, S., & Katancik, J. (2019). Instrument Selection and Application Used to Probe Dental Implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 34(1), 115–123. <https://doi.org/10.11607/jomi.6950>

Cionca, N., Hashim, D., Cancela, J., Giannopoulou, C., & Mombelli, A. (2016). Pro-inflammatory cytokines at zirconia implants and teeth. A cross-sectional assessment. *Clinical Oral Investigations*, 20(8), 2285–2291. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1729-z>

Derks, J., Schaller, D., Håkansson, J., Wennström, J. L., Tomasi, C., & Berglundh, T. (2016). Peri-implantitis - onset and pattern of progression. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(4), 383–388. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12535>

Dursun, E., & Tözüm, T. F. (2016). Peri-Implant Crevicular Fluid Analysis, Enzymes and Biomarkers: a Systemetic Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, 7(3), 1–12. <https://doi.org/10.5037/jomr.2016.7309>

Froum, S. J., & Rosen, P. S. (2012). A proposed classification for peri-implantitis. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 32(5), 533–540. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0302>

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

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

Heitz-Mayfield, L., & Mombelli, A. (2014). The Therapy of Peri-implantitis: A Systematic Review. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 29(Supplement), 325–345. <https://doi.org/10.11607/jomi.2014suppl.g5.3>

Janska, E., Mohr, B., & Wahl, G. (2015). Correlation between peri-implant sulcular fluid rate and expression of collagenase2 (MMP8). *Clinical Oral Investigations*, 20(2), 261–266. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1501-9>

Jepsen, S., Berglundh, T., Genco, R., Aass, A. M., Demirel, K., Derks, J., ... Zitzmann, N. U. (2015). Primary prevention of peri-implantitis: Managing peri-implant mucositis. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(S16), S152–S157. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12369>

Kaplan, M. M. (1994). Progress in Hepatology 93. *Journal of Hepatology*, 20(6), 847. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(05\)80164-3](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(05)80164-3)

Kent, P., & Hancock, M. J. (2016). Interpretation of dichotomous outcomes: sensitivity, specificity, likelihood ratios, and pre-test and post-test probability. *Journal of Physiotherapy*, 62(4), 231–233. <https://doi.org/10.1016/j.jphys.2016.08.008>

Kinney, J. S., Ramseier, C. A., & Giannobile, W. V. (2007). Oral Fluid-Based Biomarkers of Alveolar Bone Loss in Periodontitis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098(1), 230–251. <https://doi.org/10.1196/annals.1384.028>

Kühl, S., Zürcher, S., Zitzmann, N. U., Filippi, A., Payer, M., & Dagassan-Berndt, D. (2016). Detection of peri-implant bone defects with different radiographic techniques - a human cadaver study. *Clinical Oral Implants Research*, 27(5), 529–534. <https://doi.org/10.1111/clr.12619>

Kuula, H., Salo, T., Pirila, E., Tuomainen, A. M., Jauhiainen, M., Uitto, V.-J., ... Sorsa, T. (2009). Local and Systemic Responses in Matrix Metalloproteinase 8-Deficient Mice during *Porphyromonas gingivalis*-Induced Periodontitis. *Infection and Immunity*, 77(2), 850–859. <https://doi.org/10.1128/IAI.00873-08>

Lang, N. P., & Berglundh, T. (2011). Periimplant diseases: where are we now? - Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(SUPPL. 11), 178–181. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01674.x>

Lang N.P., Berglundh T, Heitz-Mayfield LJ, Pjetursson BE, Salvi GE, Sanz M: Consensus statements and recommended clinical procedures regarding implant survival and complications. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004, 19(Suppl):150–154.

Lang, N. P., & Lindhe, J. (2015). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* (6^a Edit).

Leefflang, M. M. G. (2014). Systematic reviews and meta-analyses of diagnostic test accuracy. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(2), 105–113. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12474>

Li, J. Y., & Wang, H.-L. (2014). Biomarkers Associated With Periimplant Diseases. *Implant Dentistry*, 23(5), 1. <https://doi.org/10.1097/ID.000000000000129>

Lindhe, J., & Meyle, J. (2008). Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth

European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(SUPPL. 8), 282–285. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01283.x>

Marrone, A., Lasserre, J., Bercy, P., & Brex, M. C. (2012). Prevalence and risk factors for peri-implant disease in Belgian adults. *Clinical Oral Implants Research*, 24(8), 934–940. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02476.x>

Mombelli, A., & Décaillot, F. (2011). The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(SUPPL. 11), 203–213. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01666.x>

Oringer, R. J., Howell, T. H., Nevins, M. L., Reasner, D. S., Davis, G. H., Sekler, J., & Fiorellini, J. P. (2001). Relationship Between Crevicular Aspartate Aminotransferase Levels and Periodontal Disease Progression. *Journal of Periodontology*, 72(1), 17–24. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.1.17>

Paknejad, M., Emtiaz, S., Khoobyari, M. M., Gharb, M. T., & Yazdi, M. T. (2006). Analysis of aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase in crevicular fluid from implants with and without peri-implantitis. *Implant Dentistry*, 15(1), 62–69. <https://doi.org/10.1097/01.id.0000202416.23259.35>

Paolantonio, M., Di Placido, G., Tumini, V., Stilio, M. Di, Contento, A., & Spoto, G. (2000). A spartate Aminotransferase Activity in Crevicular Fluid From Dental Impiants. *Journal of Periodontology*, 71(7), 1151–1157. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.7.1151>

Rakic, M., Grusovin, M., & Canullo, L. (2016). The Microbiologic Profile Associated with Peri-Implantitis in Humans: A Systematic Review. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 359–368. <https://doi.org/10.11607/jomi.4150>

Salvi, G. E., Cosgarea, R., & Sculean, A. (2017). Prevalence and Mechanisms of Peri-implant Diseases. *Journal of Dental Research*, 96(1), 31–37. <https://doi.org/10.1177/0022034516667484>

Sanz, M., & Chapple, I. L. (2012). Clinical research on peri-implant diseases: consensus report of Working Group 4. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(SUPPL.12), 202–206. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01837.x>

Smeets, R., Henningsen, A., Jung, O., Heiland, M., Hammächer, C., & Stein, J. M. (2014). Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis – a review. *Head & Face Medicine*, 10(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1746-160X-10-34>

Subbarao, K. C., Nattuthurai, G. S., Sundararajan, S. K., Sujith, I., Joseph, J., & Syedshah, Y. P. (2019). Gingival Crevicular Fluid: An Overview. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 11(Suppl 2), S135–S139. https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_56_19

Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, 89(February), S159–S172. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006>

UniProtKB. (2019). P22894 (MMP8_HUMAN). Disponível em <https://www.uniprot.org/uniprot/P22894>

UniProtKB. (2019). P05186 (PPBT_HUMAN). Disponível em <https://www.uniprot.org/uniprot/P05186>

Wang, H.-L., Garaicoa-Pazmino, C., Collins, A., Ong, H.-S., Chudri, R., & Giannobile, W. V. (2016). Protein biomarkers and microbial profiles in peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 27(9), 1129–1136. <https://doi.org/10.1111/clr.12708>

Wang, H., & Ren, D. (2017). Controlling *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus* biofilms with direct current and chlorhexidine. *AMB Express*, 7(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0505-z>

Yaghobee, S., Khorsand, A., Ghohroudi, A. A. R., Sanjari, K., & Kadkhodazadeh, M. (2014). Assessment of interleukin-1beta and interleukin-6 in the crevicular fluid around

healthy implants, implants with peri-implantitis, and healthy teeth: a cross-sectional study. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 40(5), 220. <https://doi.org/10.5125/jkaoms.2014.40.5.220>

Zani, S. R., Moss, K., Shibli, J. A., Teixeira, E. R., de Oliveira Mairink, R., Onuma, T., ... Teles, R. P. (2016). Peri-implant crevicular fluid biomarkers as discriminants of peri-implant health and disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(10), 825–832. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12586>

ANEXOS

I.



Consentimento Informado

Código | IMP:EM.PE.17_02

Monte de Caparica, ____ de ____ de ____

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito do mestrado de Medicina Dentária na Unidade Curricular de Orientação Tutorial de Projecto Final do(a) Instituto Universitário Egas Moniz, sob a orientação do Professor Doutor Ricardo Castro Alves, solicita-se autorização para a participação no estudo "Fosfatase alcalina e Aspartato aminotransferase como biomarcadores de peri-implantite".

Este estudo tem como objetivo avaliar a atividade de duas enzimas (fosfatase alcalina e da aspartato aminotransferase) recolhidas do fluido crevicular (líquido produzido pela gengiva) como potencial marcador para o diagnóstico precoce da peri-implantite (perda óssea à volta dos implantes) e verificar se o nível de severidade da peri-implantite se relaciona com a atividade das enzimas mencionadas.

A recolha demorará apenas breves minutos e será efetuada de forma não invasiva, com desconforto mínimo, com recurso a pontas de papel esterilizadas.

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

Este estudo pode trazer benefícios tais como encontrar uma forma de diagnóstico precoce da peri-implantite, permitir uma melhor monitorização da doença e resposta ao tratamento.

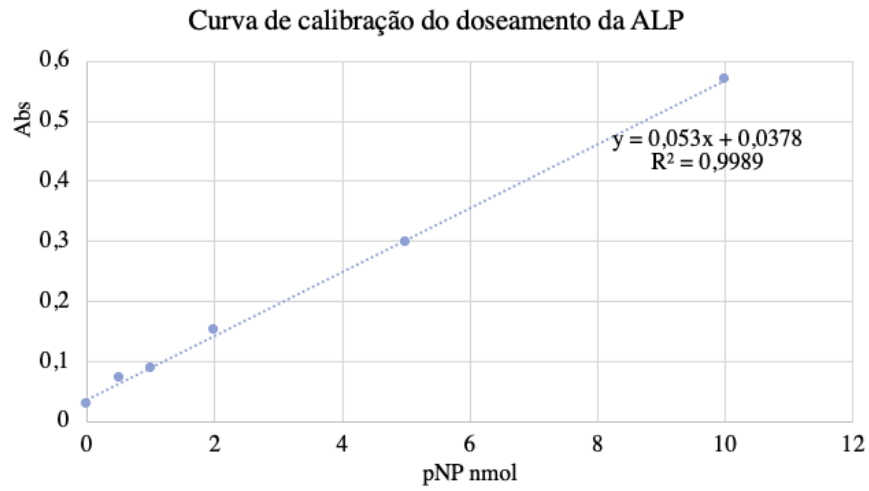
A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e/ou publicação e será tratada pelo(s) orientador(es) e/ou pelos seus mandatados. A sua recolha é anónima e confidencial.

(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.

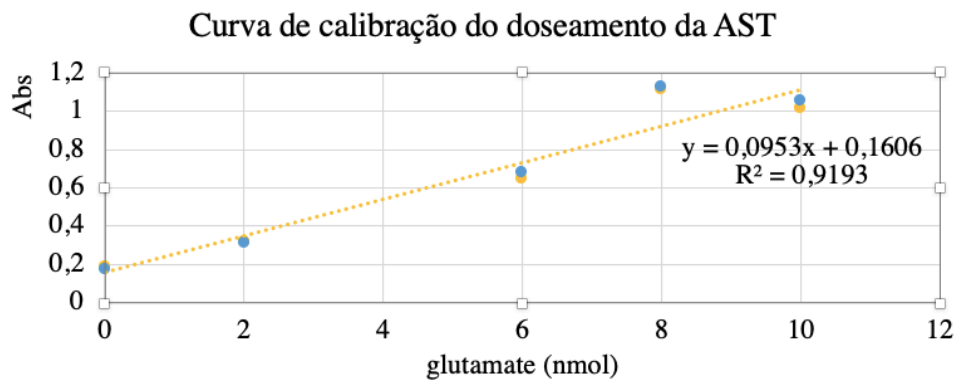
(Assinatura do participante ou, no caso de menores, do pai/mãe ou tutor legal)

II.



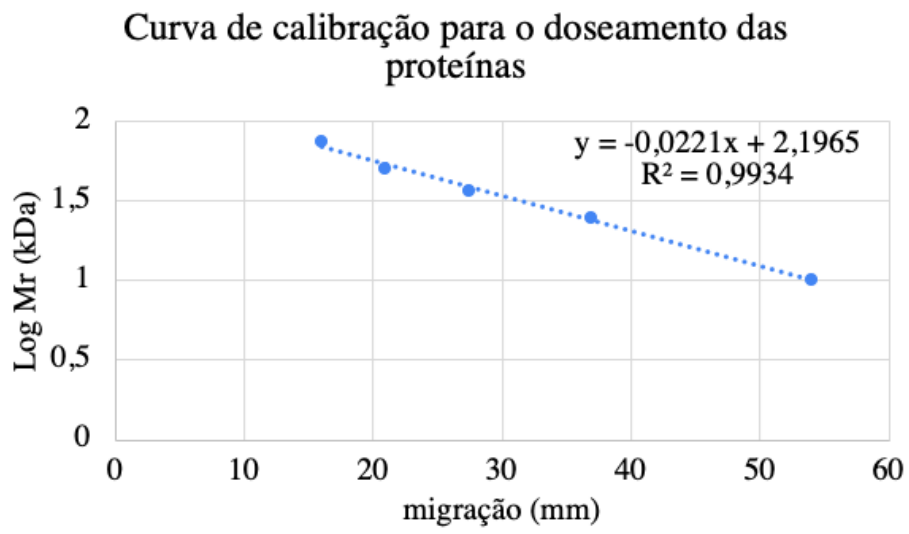
Representação da absorvância medida ao comprimento de onda 405 nm em função do produto da reação (p-nitrofenolato).

III.



Representação da absorvância medida ao comprimento de onda 450 nm em função do produto da reação (glutamato).

IV.



Representação da massa molecular das proteínas do marcador (Log Mr) em função da distância migrada após electroforese

V.



EGAS MONIZ

Autorização para realização de trabalho de Investigação na Clínica Dentária Universitária Egas Moniz

Código | IMP.CDEM.05_00

IDENTIFICAÇÃO DO INVESTIGADOR RESPONSÁVEL: Profº Doutor Ricardo Castro Alves
ricardocastroalves@gmail.com

TÍTULO DO TRABALHO: Fosfatase alcalina e Aspartato aminotransferase como biomarcadores de peri-implantite : Estudo piloto.

Excelentíssima Professora Doutora Fernanda de Mesquita–Presidente da Comissão de Ética,

O Médico Prof. Doutor Ricardo Castro Alves e a sua equipa podem utilizar a Clínica Dentária Universitária Egas Moniz (CDUEM), para realização da investigação da Fosfatase alcalina e Aspartato aminotransferase como biomarcadores de peri-implantite : Estudo piloto.

Aguardo a aprovação da Comissão Científica e da Comissão de Ética, para cedência das instalações e dos doentes da clínica de acordo com o normal funcionamento da Clínica.

Atenciosamente, com os melhores cumprimentos

Monte da Caparica, 31 de Janeiro de 2019

Direção Clínica

VI.

Comissão de Ética



Proc. Interno nº 705

Ex.ma Senhora
Yana Slovinska


Monte de Caparica, 13 de fevereiro de 2019.

Ex.ma Senhora,

Em resposta ao Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado **“Fosfatase alcalina e Aspartato aminotransferase como biomarcadores de peri-impantide: Estudo Piloto”**, foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz


Prof.ª. Doutora Maria Fernanda de Mesquita