



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**AS METALOPROTEINASES COMO BIOMARCADORES DA
DOENÇA PERIODONTAL – ESTUDO PILOTO**

Trabalho submetido por
Mariana Anastácio do Carmo
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

novembro de 2021



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**AS METALOPROTEINASES COMO BIOMARCADORES DA
DOENÇA PERIODONTAL – ESTUDO PILOTO**

Trabalho submetido por
Mariana Anastácio do Carmo
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof.^a Doutora Madalena Oom

e coorientado por
Prof. Doutor Ricardo Alves

novembro de 2021

Aos meus pais e à minha irmã.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Doutora Madalena Oom, por toda a dedicação que demonstrou por este estudo. Sentir-me-ei sempre grata por tudo o que me ensinou e orgulhosa da equipa que formámos.

Ao Prof. Doutor Ricardo Alves, por me ter transmitido tantos conhecimentos na área da Periodontologia, de modo tão paciente e amistososo.

Ao IUEM e a todo o corpo docente, por me terem proporcionado uma formação de excelência.

À Susana e à Natacha, por me terem acolhido e ajudado, tão carinhosamente, durante os longos ciclos laboratoriais.

Aos restantes funcionários, por todas as palavras amigas nos momentos de stresse e cansaço.

Aos meus pais, por todo o amor, por toda a confiança e por todos os sacrifícios. Por fazerem dos meus sonhos os seus e por me terem permitido chegar até aqui.

À minha irmã, por ser um exemplo a seguir e por me ter acompanhado, encorajado e ajudado em todos os momentos da minha vida.

À minha avó, por todo o afeto e suporte que sempre me deu.

À minha colega e amiga do coração, Sofia Alves, por todo o amparo mútuo, por mais uma etapa que ultrapassámos juntas e por esta amizade, que espero que seja eterna.

Aos meus restantes familiares e amigos, por me terem transmitido tanta força e incentivo a cada passo deste longo percurso.

A todos, muito obrigada.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a presença de MMP ativas no FCG de pacientes com doença periodontal - grupo de estudo - por comparação a pacientes com saúde periodontal - grupo de controlo -, a fim de determinar se estas enzimas podem atuar como biomarcadores da doença.

Metodologia: Participaram neste estudo cinco pacientes com saúde periodontal e cinco pacientes com periodontite. O fluido foi recolhido por Periopapers em sulcos gengivais e bolsas periodontais e quantificado no Periotron. A presença de MMP ativas nas amostras de FCG foi analisada por zimografia de colagénio.

Resultados: O volume de FCG foi superior em bolsas periodontais (154 ± 38 (n=8)) do que em sulcos gengivais (26 ± 17 (n=10)). A incubação dos géis por um período de tempo alargado permitiu detetar um maior número de bandas proteolíticas previsivelmente correspondentes a formas enzimáticas inativas (pró-MMP-8/pró-MMP-13) e ativas (MMP-1/MMP-13 e MMP-2), tendo sido observadas diferenças entre os grupos estudados.

Conclusão: A utilização de Periopapers e do Periotron constituiu um método adequado de recolha e quantificação de FCG. A atividade proteolítica das MMP apresentou diferenças entre os dois grupos estudados, o que revela que estas enzimas podem ser indicadas como biomarcadores da doença.

Palavras-chave: doença periodontal, fluido crevicular gengival, metaloproteinases, biomarcadores

ABSTRACT

Objective: To evaluate the presence of active MMPs in the GCF of patients with periodontal disease - study group - in comparison with patients with periodontal health - control group -, in order to determine whether these enzymes can act as biomarkers of the disease.

Methodology: Five patients with periodontal health and five patients with periodontitis participated in this study. The fluid was collected by Periopapers in gingival sulcus and periodontal pockets and quantified in Periotron. The presence of active MMPs in GCF samples was analyzed by collagen zymography.

Results: The volume of GCF was higher in periodontal pockets (154 ± 38 (n=8)) than in gingival sulcus (26 ± 17 (n=10)). The incubation of the gels for an extended period of time allowed to detect a greater number of proteolytic bands predictably corresponding to inactive (pro-MMP-8/pro-MMP-13) and active (MMP-1/MMP-13 and MMP-2) enzymatic forms, with differences between the studied groups being observed.

Conclusion: The use of Periopapers and Periotron was an adequate method for collecting and quantifying GCF. The proteolytic activity of MMPs showed differences between the two groups studied, which reveals that these enzymes can be indicated as biomarkers of the disease.

Keywords: periodontal disease, gingival crevicular fluid, metalloproteinases, biomarkers

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	9
1. Doença Periodontal	9
1.1. Periodontite	10
1.1.1. Etiologia	10
1.1.2. Manifestações Clínicas	11
1.1.3. Fatores de Risco	11
1.1.4. Classificação	12
1.1.5. Diagnóstico	13
2. Fluido Crevicular Gengival	14
2.1. Meio de Diagnóstico para a Doença Periodontal	14
3. Metaloproteinases	16
3.1. Definição e Função	16
3.2. Secreção e Ativação	17
3.3. Regulação	18
3.4. Atuação como Biomarcadores da Doença Periodontal	18
3.5. Atuação como Reguladores da Doença Periodontal	21
II. METODOLOGIA	23
1. Considerações Gerais	23
2. Seleção dos Participantes com Critérios de Inclusão e Exclusão	23
3. Avaliação Periodontal dos Participantes	24
4. Recolha e Quantificação de Amostras de Fluido Crevicular Gengival	24
5. Análise da Atividade das Metaloproteinases por Zimografia	26
III. RESULTADOS	29
1. Caracterização da Amostra Populacional	29
2. Análise Volumétrica das Amostras Recolhidas	29
3. Análise da Atividade Proteolítica das Amostras Recolhidas	31

IV. DISCUSSÃO	37
V. CONCLUSÃO	43
VI. BIBLIOGRAFIA.....	45
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Cascata de ativação das MMP no catabolismo do tecido conjuntivo durante a periodontite (Adaptado de Checchi <i>et al.</i> , 2020).....	20
Figura 2 - Regulação da inflamação e destruição periodontal pelas MMP (Adaptado de Cavalla <i>et al.</i> , 2017).....	22
Figura 3 - Método de recolha e quantificação de FCG com recurso ao Periopaper (à esquerda) e ao Periotron (à direita).....	25
Figura 4 - Curva de calibração do Periotron	26
Figura 5 - Volumes de FCG quantificados pelo Periotron	31
Figura 6 - Gel de calibração para identificação e quantificação da enzima MMP-8.....	32
Figura 7 - Curva de calibração da enzima MMP-8	32
Figura 8 - Gel de eletroforese com amostras do grupo de controlo incubado por 19 h.....	34
Figura 9 - Gel de eletroforese com amostras do grupo de estudo incubado por 19 h.....	34
Figura 10 - Gel de eletroforese com amostras do grupo de controlo incubado por 6 h....	35
Figura 11 - Gel de eletroforese com amostras do grupo de estudo incubado por 6 h.....	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do FCG (Adaptado de Barros <i>et al.</i> , 2016).....	14
Tabela 2 - Resultados da recolha e quantificação de FCG no grupo de controlo.....	30
Tabela 3 - Resultados da recolha e quantificação de FCG no grupo de estudo	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDEM – Clínica Dentária Egas Moniz

CiiEM – Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz

CL – Centro-Lingual

CP – Centro-Palatino

DP – Disto-Palatino

DV – Disto-Vestibular

FCG – Fluido Crevicular Gengival

IUEM – Instituto Universitário Egas Moniz

MEC – Matriz Extracelular

MIMD – Mestrado Integrado em Medicina Dentária

MMP – Metaloproteinase(s)

MPO – Mieloperoxidase

MV – Mesio-Vestibular

PBS – Tampão Fosfato Salino

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

TIMP – Inibidores Teciduais de Metaloproteinases

UA – Unidade Arbitrária

I. INTRODUÇÃO

1. Doença Periodontal

A doença periodontal consiste no processo patológico que atinge o periodonto, no qual se inclui a gengiva, o ligamento periodontal, o cemento radicular e o osso alveolar, que desempenham uma função de suporte ao redor das peças dentárias (Kinane, 2001). Esta é uma doença inflamatória motivada por infecção bacteriana e induzida pela resposta imunológica do hospedeiro. A gengivite, que acomete o complexo gengival com sinais inflamatórios devido à acumulação de placa bacteriana, é a manifestação mais branda da doença periodontal e pode ser revertida através da implementação de práticas de higiene oral adequadas. Quando não tratada, a doença pode evoluir para um estado crónico, destrutivo e irreversível, sucedendo a periodontite (Kinane *et al.*, 2007). Neste caso, bactérias patogénicas invadem os tecidos periodontais mais profundos, desencadeando no paciente uma resposta imunológica intensificada gerada para efeitos protetores. No entanto, neste processo de resistência às bactérias por meio dos mecanismos de defesa do hospedeiro, os tecidos periodontais são destruídos. Quando instalada, a periodontite causa perda de inserção periodontal, prossegue com reabsorção do osso alveolar e pode levar à eventual perda dos elementos dentários afetados, constituindo a principal causa de perda dentária na população adulta (Kinane *et al.*, 2017; Gasner & Schure, 2021).

No decorrer da vida quotidiana, a doença periodontal tem um impacto negativo significativo na qualidade de vida relacionada com a saúde oral dos indivíduos portadores da doença (Ferreira *et al.*, 2017; Fischer *et al.*, 2020) e gera consideráveis custos de saúde (Helal *et al.*, 2019). A perda dentária, consequência mais grave da periodontite, afeta negativamente a qualidade de vida geral (Haag *et al.*, 2017; Fischer *et al.*, 2020), na medida em que acomete a componente funcional, física e psicológica dos indivíduos, pelas dificuldades que causa no âmbito da mastigação e deglutição, desconforto e aparência. Deste modo, o diagnóstico precoce e o tratamento da doença dão um importante contributo para a promoção da saúde geral (Buset *et al.*, 2016; Fischer *et al.*, 2020).

No âmbito da celebração do Dia Mundial da Saúde Periodontal (uma iniciativa da Federação Europeia de Periodontologia), a Ordem dos Médicos Dentistas em associação com a Sociedade Portuguesa de Periodontologia e Implantes (2021) noticiou que a doença

periodontal atinge cerca de 50% da população mundial, constituindo a 6ª patologia mais prevalente no mundo. O desenvolvimento da doença é silencioso, sem grandes sinais clínicos e dissociado de dor (Kinane *et al.*, 2017; Neves *et al.*, 2019), e esse é o principal motivo encontrado para estes dados epidemiológicos. Assim sendo, os pacientes não procuram diagnosticar e tratar a doença periodontal junto do seu médico dentista, o que torna fundamental apostar na prevenção e diagnóstico precoce da doença, de modo a travar e controlar prematuramente a sua evolução e diminuir a sua prevalência à escala mundial.

Em Portugal, a prevalência da doença periodontal está acima da média mundial e a aumentar continuamente (Machado *et al.*, 2020). Um estudo transversal regional de apuramento do nível de periodontite na população adulta da região sul da Área Metropolitana de Lisboa (Almada-Seixal), através do qual foi possível concluir que existe um elevado nível da doença na amostra populacional estudada (Botelho *et al.*, 2019), corrobora os anteriores dados epidemiológicos.

A Sociedade Portuguesa de Periodontologia e Implantes (2021) refere que são necessários estudos adicionais, com amostras populacionais alargadas, para ser possível caracterizar epidemiologicamente a população portuguesa no domínio da doença periodontal.

1.1. Periodontite

1.1.1. Etiologia

A flora bacteriana oral é composta por bactérias comensais que coexistem em relativa harmonia com o hospedeiro. Porém, quando ocorre acumulação de placa bacteriana no meio oral, pode gerar-se um estado de disbiose através de interações no biofilme, que culmina no crescimento exacerbado de bactérias patogénicas associadas à doença periodontal (Lang & Bartold, 2018).

O desenvolvimento da periodontite ocorre devido à presença de espécies bacterianas patogénicas nos espaços subgengivais, que desencadeia uma resposta imunológica inflamatória, pelas vias inata e adaptativa, por parte do hospedeiro (Kinane

et al., 2007; Amano, 2010; Liang *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015). A via inata constitui a primeira linha de defesa do organismo e é capaz de reconhecer e desencadear mecanismos inflamatórios para eliminar bactérias invasoras. Estes mecanismos são aprimorados pela via adaptativa, produzida por células imunológicas e mediadores inflamatórios com destaque no cenário de patogênese da periodontite, pois atuam isolada ou conjuntamente na defesa do hospedeiro e, simultaneamente, na destruição do periodonto. Assim, a regulação da progressão da doença periodontal é dada pela amplitude da resposta imunológica do hospedeiro perante a invasão de bactérias patogénicas aos tecidos periodontais, bem como pela respetiva suscetibilidade para a doença, sob influência de fatores genéticos, ambientais e comportamentais (Silva *et al.*, 2015).

1.1.2. Manifestações Clínicas

Ainda que a instalação da periodontite seja tipicamente indolor (Kinane *et al.*, 2017; Neves *et al.*, 2019), há sinais clínicos que indiciam a sua presença. Nestes pacientes ocorre o aumento do sulco gengival dando lugar à formação de uma bolsa periodontal, processo motivado por perda de suporte gengival e ligamentar e diminuição do nível ósseo (Pihlstrom *et al.*, 2005; Neves *et al.*, 2019). Comummente, os doentes apresentam mau hálito, eritema e hemorragia gengival (Laudenbach & Simon, 2014; Neves *et al.*, 2019), recessão da margem gengival com consequente exposição radicular e mobilidade dentária aumentada, o que pode conduzir à perda dos dentes acometidos pela doença (Kinane, 2001; Neves *et al.*, 2019), e podem ainda relatar a ocorrência de sensibilidade dentária (Laudenbach & Simon, 2014; Neves *et al.*, 2019).

1.1.3. Fatores de Risco

Hábitos de higiene oral desadequados (Nazir, 2017; Lang & Bartold, 2018; Murakami *et al.*, 2018), tabagismo (Zee, 2009; Nazir, 2017; Murakami *et al.*, 2018), *diabetes mellitus* (Negrato & Tarzia, 2010; Chapple & Genco, 2013; Preshaw & Bissett, 2013; Casanova *et al.*, 2014; Nazir, 2017), alterações hormonais em pacientes do sexo

feminino (Wu *et al.*, 2015; Nazir, 2017; Morelli *et al.*, 2018; Murakami *et al.*, 2018), administração de determinados fármacos (Nazir, 2017; Hughes & Bartold, 2018; Soto & Meyer, 2021) e quadros clínicos de stresse (Segerstrom & Miller, 2004; Reners & Brex, 2007; Rai *et al.*, 2011; Nazir, 2017) constituem os principais fatores de risco modificáveis para o desenvolvimento da periodontite. Por outro lado, a idade (Gil-Montoya *et al.*, 2017; López *et al.*, 2017; Nazir, 2017; Soto & Meyer, 2021) e a hereditariedade (Susin *et al.*, 2014; Nazir, 2017) constituem os principais fatores de risco não modificáveis.

1.1.4. Classificação

A doença periodontal sob forma de periodontite é clinicamente caracterizada por perda de inserção periodontal interproximal em dois ou mais dentes não adjacentes ou perda de inserção periodontal superior ou igual a 3 mm em bolsas superiores a 3 mm detetáveis em dois ou mais dentes, sem que a causa seja recessão gengival de origem traumática, cárie dentária que se estenda à região cervical do dente, perda de inserção periodontal na face distal de um segundo molar associada ao mau posicionamento ou extração de um terceiro molar, lesão endodôntica que drene através do periodonto marginal e ocorrência de fratura radicular vertical. De acordo com o *Workshop* Mundial de Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-Implantares, coapresentada pela Academia Americana de Periodontologia e pela Federação Europeia de Periodontologia (2017), a periodontite em cada paciente é atualmente classificada de acordo com o estadio e grau em que se insere. O estadio indica a gravidade e complexidade da doença, já o grau está relacionado com o risco de progressão, podendo ser modificado pela presença de fatores de risco (tabagismo e *diabetes mellitus*). Os estadios distribuem-se de I a IV, em que o estadio I designa periodontite inicial, o II periodontite moderada, o III periodontite severa com potencial adicional de perda dentária e o IV periodontite avançada com extensa perda dentária e potencial perda da dentição. Ao estadio determinado deverá ser acrescentada a extensão e distribuição da doença, que pode ser localizada (menos de 30% de dentes envolvidos), generalizada (mais de 30% de dentes envolvidos) ou padrão incisivo/molar. Relativamente ao grau, existem três possibilidades de classificação, em que o grau A prevê uma taxa de progressão lenta, o grau B uma taxa de progressão moderada e o grau C uma taxa de progressão rápida (Tonetti *et al.*, 2018).

1.1.5. Diagnóstico

O primeiro desafio na abordagem à doença periodontal é a realização de um diagnóstico correto e atempado, uma vez que os danos causados pela periodontite são irreversíveis (Kinane, 2001; Neves *et al.*, 2019). Atualmente, os métodos utilizados para o diagnóstico e reavaliação periodontal, que deve ser realizada regularmente na tentativa de monitorizar a evolução e otimizar o tratamento da doença (Stathopoulou *et al.*, 2015; Neves *et al.*, 2019), são baseados em achados clínicos e radiográficos (Academia Americana de Periodontologia, 2015; Saito *et al.*, 2017; Neves *et al.*, 2019).

No entanto, é pretendida uma mudança de paradigma, uma vez que a avaliação dos parâmetros clínicos depende, em grande parte, da experiência e destreza do médico dentista, o que pode desencadear desacordos no diagnóstico clínico. Assim, meios de diagnóstico alternativos baseados em medições quantitativas e objetivas são necessários para auxiliar no rastreio da doença (Saito *et al.*, 2017). Para além disso, os métodos clínicos e radiográficos usuais são retrospectivos, ou seja, não refletem a destruição periodontal causada pela doença no momento presente e prospetivo à consulta (Almehmadi & Alghamdi, 2018).

Neste sentido, ao longo dos últimos anos, vários estudos têm contribuído para o desenvolvimento de novos meios que providenciem o diagnóstico precoce e predição da evolução da doença periodontal com base na resposta imunológica do hospedeiro, com vista à prevenção do seu desenvolvimento.

A verdadeira importância do acima referido é encontrar biomarcadores que indiquem a ocorrência do processo patológico sem que tenham ocorrido vastos danos clínicos, isto é, que tenham a capacidade de detetar a doença em fases subclínicas sem repercussões visíveis no periodonto (Barros *et al.*, 2016).

É nesta perspetiva que o fluido crevicular gengival (FCG) é considerado um fluido oral promissor para o diagnóstico da doença periodontal, uma vez que entre os seus constituintes existem biomarcadores que podem ser utilizados para indicar a atividade da doença em tempo real, contrariamente aos métodos de diagnóstico trivialmente utilizados (Almehmadi & Alghamdi, 2018).

2. Fluido Crevicular Gengival

2.1. Meio de Diagnóstico para a Doença Periodontal

Os fluidos orais podem prestar-se como base para o desenvolvimento de testes de diagnóstico para a doença periodontal, devido à facilidade de recolha e abundância em biomarcadores locais e sistêmicos. Entre eles está o FCG, um fluido fisiológico oral gerado a partir dos vasos sanguíneos gengivais, com funções de higiene dos espaços subgengivais e de defesa da gengiva por ação antibacteriana, cuja composição começa a assemelhar-se à de um exsudado inflamatório aquando da instalação de um quadro patológico no periodonto (Barros *et al.*, 2016; Bathla, 2017). A composição do fluido, descrita na Tabela 1, apresenta-se desigual entre pacientes com saúde e doença periodontal, bem como durante a progressão da doença, especialmente ao nível da concentração de biomarcadores moleculares (Tsuchida *et al.*, 2014; Huynh *et al.*, 2015; Barros *et al.*, 2016; Bathla, 2017; Khurshid *et al.*, 2017). Assim, prevê-se que esses biomarcadores possam ser utilizados para determinar o diagnóstico e prognóstico da doença periodontal em cada paciente (Barros *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Composição do FCG (Adaptado de Barros *et al.*, 2016).

Componentes	Origem	Funções
Bactérias	Biofilme Oral	Iniciam a Resposta Inflamatória do Hospedeiro
Células Epiteliais	Epitélio Sulcular e Juncional	Representam a Elevada Renovação Celular do Sulco Gengival
Leucócitos	Plexo de Vasos Sanguíneos Gengivais	Leucócitos Polimorfonucleares: Imunidade Inata Monócitos, Macrófagos e Linfócitos: Imunidade Mediada por Células
Eritrócitos	Vasos Sanguíneos Gengivais	Resultam de Pequenos Vasos Sanguíneos e Danos Capilares
Fosfatase Alcalina	Osteoblastos; Osteoclastos; Fibroblastos; Neutrófilos	Intervêm na Geração de Superóxido e na Primeira Linha de Defesa
Catepsina B	Macrófagos	Enzima Ativa na Proteólise
Metaloproteinase-8	Neutrófilos	Enzima Ativa na Proteólise de Colagénio
Metaloproteinase-9	Neutrófilos	É Responsável pela Hidrólise da Matriz Extracelular

Tabela 1 - Continuação.

Elastase Derivada de Neutrófilos	Neutrófilos	Clivagem de Elastina, Colagénio e Proteoglicanos
Metaloproteinase-12	Macrófagos	Clivagem de Elastina, Colagénio e Proteoglicanos
Telopeptídeo Carboxiterminal do Colagénio Tipo I	Fragmentos de Colagénio Tipo I Provenientes do Osso	Altamente Correlacionado com a Renovação Óssea
Interleucina-1 β	Macrófagos	Regula as Reações Inflamatórias e Estimula a Reabsorção Óssea
Interleucina-4	Basófilos	Tem Ação Anti-Inflamatória, Está Envolvida na Inibição de Macrófagos e Diferenciação de Células Th2
Interleucina-6	Osteoblastos; Macrófagos; Células T	Estimula a Formação de Osteoclastos e Regula o Crescimento de Células T e B
Interleucina-8	Células Epiteliais; Macrófagos	Recruta e Ativa Neutrófilos
Interferão- γ	Leucócitos; Linfócitos	Ativa Macrófagos e Suprime Células Th2
Imunoglobulina A	Células Plasmáticas B	Neutraliza o Antígeno
Imunoglobulina G	Células Plasmáticas B	Neutraliza o Antígeno
Imunoglobulina M	Células Plasmáticas B	Neutraliza o Antígeno
Lactoferrina	Células Acinares; Leucócitos Polimorfonucleares	Tem Ação Antibacteriana e Cria um Ambiente Limitador de Ferro
Lisozima	Leucócitos Polimorfonucleares; Macrófagos	É Responsável pela Hidrólise de Peptidoglicanos da Parede Celular Bacteriana
Osteoprotegerina	Osteoblastos	É o Recetor Chamariz para o Ligante do Recetor Ativador do Fator Nuclear κ B e Inibe a Formação de Osteoclastos
Osteocalcina	Osteoblastos	Liga-se ao Cálcio
Prostaglandina E2	Todos os Tipos de Células	Tem Efeitos Pró-Inflamatórios e Imunomoduladores
Fator de Crescimento Transformador α	Queratinócitos; Macrófagos	Regula a Reparação de Tecidos, Proliferação Celular, Quimiotaxia, Diferenciação e Síntese de Matriz
Fator de Crescimento Transformador β	Macrófagos	Modula a Produção de Citocinas Pró-Inflamatórias
Inibidores Teciduais de Metaloproteinases	Queratinócitos; Fibroblastos; Neutrófilos; Macrófagos	Inibem as Metaloproteinases
Fator de Necrose Tumoral α	Neutrófilos; Macrófagos; Linfócitos	Atrasa a Apoptose de Neutrófilos

Os componentes do FCG estão envolvidos num conjunto de vias celulares e moleculares interatuantes. As vias moleculares de maior destaque para o desenvolvimento da doença periodontal são as que envolvem as metaloproteínases (MMP), nomeadamente a MMP-8, também chamada de colagenase derivada de neutrófilos ou colagenase-2. Amplamente reconhecida como a enzima proteolítica com principal responsabilidade sobre a destruição periodontal ativa, é capaz de degradar o colagénio tipo I, principal componente da matriz extracelular (MEC) do tecido conjuntivo periodontal, motivo pelo qual tem sido apontada como um possível biomarcador da doença (Al-Majid *et al.*, 2018). A forma de atuação das MMP sobre a doença periodontal será explicada mais adiante.

Não só a composição como também a quantidade de FCG se altera de acordo com o estado de saúde dos tecidos periodontais. No sulco gengival, a quantidade de fluido é menor, que aumenta progressivamente quando é instalado um processo de inflamação e destruição periodontal (Subbarao *et al.*, 2019). Além da inflamação gengival e do intervalo de tempo após cirurgia periodontal (até à completa cicatrização), os principais fatores estimulantes do fluxo de FCG são: período circadiano (o fluxo aumenta das 6 às 10 h da manhã e depois diminui), escovagem vigorosa, mastigação de alimentos duros, hábitos tabágicos, período de ovulação, presença de enzimas e hormonas sexuais, ingestão de contraceptivos e aplicação tópica de histaminas (Bathla, 2017; Khurshid *et al.*, 2017; Subbarao *et al.*, 2019).

3. Metaloproteínases

3.1. Definição e Função

As MMP são uma família de enzimas proteolíticas dependentes de zinco e cálcio, cuja função principal é remodelar a MEC de todos os tecidos do corpo humano (Checchi *et al.*, 2020; Orozco-Paéz *et al.*, 2021).

O colagénio, a gelatina, a elastina, a laminina, a fibronectina e os proteoglicanos são os principais componentes da MEC que servem de substrato a estas enzimas, que atuam de modo a degradar as ligações peptídicas estabelecidas entre os seus aminoácidos,

o que resulta na destruição das fibras que dão suporte e resistência à matriz (Checchi *et al.*, 2020).

As MMP podem ser agrupadas em seis classes, de acordo com a especificidade e homologia do substrato preferencial: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelisinases (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), MMP de membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25) e outras MMP (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 e MMP-28) (Sternlicht & Werb, 2001; Visse & Nagase, 2003; Mazzoni *et al.*, 2012; Checchi *et al.*, 2020). Embora tenham substratos preferenciais, estas peptidases podem atuar sobre vários substratos, entre os quais citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, hormonas, recetores celulares e moléculas de adesão (Laronha *et al.*, 2020).

3.2. Secreção e Ativação

As MMP são secretadas por várias células no periodonto, as residentes - células epiteliais, queratinócitos, células do ligamento periodontal, osteoblastos, osteoclastos e fibroblastos - e as imunológicas, com ação antibacteriana (Sorsa *et al.*, 2006).

As MMP são produzidas como pró-enzimas devido à existência de uma ligação entre o pró-peptídeo aminoterminal (pró-domínio), designadamente por um resíduo de cisteína, ao ião Zn^{2+} no centro ativo em cada MMP (Boelen *et al.*, 2019; Checchi *et al.*, 2020), que impede que estas peptidases se liguem ao substrato correspondente. No entanto, quando ocorre a clivagem desta ligação, uma molécula de H_2O ocupa o centro ativo e as MMP tornam-se ativas e aptas para hidrolisar ligações peptídicas (Hu *et al.*, 2007; Boelen *et al.*, 2019; Checchi *et al.*, 2020). A ativação é realizada por clivagem do pró-domínio libertando o ião Zn^{2+} da cisteína ou também pode ocorrer por via química, por oxidação do pró-peptídeo causada pela reação com o O_2 (Cavalla *et al.*, 2017; Boelen *et al.*, 2019; Checchi *et al.*, 2020).

3.3. Regulação

Em condições fisiológicas normais, as atividades das MMP são reguladas por meio de expressão genética, nomeadamente ao nível da transcrição, por interação com constituintes específicos da MEC, por ativação pró-enzimática por outras peptidases (incluindo outras MMP) ou por inibição enzimática por inibidores endógenos como inibidores teciduais de metaloproteínases (TIMP), que controlam as atividades locais das MMP (Visse & Nagase, 2003; Cui *et al.*, 2017; Laronha *et al.*, 2020).

Existindo um equilíbrio entre as MMP e os seus inibidores, é possível controlar processos fisiológicos (Laronha *et al.*, 2020). No entanto, uma desregulação neste equilíbrio pode levar ao desenvolvimento de processos patológicos, pois em situações em que exista uma sobreprodução de MMP por células residentes em complementaridade com células imunológicas recrutadas no processo inflamatório como resposta a uma lesão, a ação inibitória por parte de TIMP fica fortemente comprometida (Vandenbroucke & Libert, 2014; Fields, 2019).

As MMP regulam os processos fisiológicos de reparação tecidual (Benjamin & Khalil, 2012; Silva *et al.*, 2014) e o equilíbrio entre a produção de proteínas da MEC e a sua ação determina a remodelação dos tecidos, tanto na condição de homeostase como na resposta a uma lesão (Dalton *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2014). Em situações em que se manifeste um descontrolo ao nível da expressão e cinética de atuação das MMP, devido a altas taxas de síntese e/ou carência de mecanismos regulatórios/inibitórios, podem ocorrer efeitos danosos para o tecido conjuntivo do periodonto. Os tecidos periodontais têm uma rápida capacidade de remodelação e adaptação às alterações mecânicas (Bildt *et al.*, 2008), todavia, uma resposta imunológica inflamatória intensificada e prolongada, marcada pela ação exacerbada das MMP, pode viabilizar a perda das propriedades mecânicas normais dos tecidos e contribuir para a cronicidade da lesão (Meyer *et al.*, 2008; Murphy & Nagase, 2008; Silva *et al.*, 2014).

3.4. Atuação como Biomarcadores da Doença Periodontal

Tem sido detetado no FCG e associado ao início e progressão da doença periodontal um elevado número de bactérias e produtos derivados do hospedeiro, gerados

como resposta imunológica à sua presença. Perante a existência de bactérias patogénicas nos espaços subgingivais, ocorre a ativação acentuada da resposta imunológica inflamatória pela via inata, mediada por neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares) (Silva *et al.*, 2015), que representam entre 95 a 97% das células do sistema imunológico no fluido, detendo prevalência quantitativa em relação a células B (71%), células T (29%), monócitos (2-3%) e linfócitos (1-2%) (Bathla, 2017).

Os neutrófilos são os primeiros elementos celulares imunológicos a atuar face à infeção bacteriana e a continuidade da resposta do hospedeiro é baseada principalmente na sua ação. Embora a sua função seja essencialmente protetora, quando se dá a disseminação de bactérias patogénicas no periodonto ocorrem alterações na sua expressão e estes passam a ter capacidade de adesão, resposta de quimiotaxia e função fagocítica. Dos seus grânulos citoplasmáticos, onde estão armazenadas enzimas, são libertadas as MMP-8 e MMP-9, que quando se associam a outras MMP produzidas por fibroblastos e ativadas no FCG, originam a cascata de ativação das MMP, proporcionando a degradação exacerbada do tecido conjuntivo do periodonto (Chibebe *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2015).

Localmente, durante o processo inflamatório, os lipopolissacarídeos bacterianos estimulam os monócitos a libertar mediadores inflamatórios como MMP adicionais, nomeadamente collagenases, que acentuam a destruição local do colagénio tipo I (Chibebe *et al.*, 2008).

As espécies reativas de O₂ também induzem a ativação das principais MMP por oxidação enzimática direta (Cavalla *et al.*, 2017; Boelen *et al.*, 2019; Checchi *et al.*, 2020). As bactérias patogénicas e os seus fatores de virulência, as citocinas e as prostaglandinas potenciam a desgranulação de neutrófilos, o que resulta na libertação da mieloperoxidase (MPO) a partir dos seus grânulos primários (Scott & Krauss, 2012; Leppilahti *et al.*, 2014; Alfakry *et al.*, 2016; Cavalla *et al.*, 2017). Por sua vez, a MPO é capaz de catalisar a conversão de HOCl que tem, para além da sua atividade antibacteriana, uma importante ação na regulação do catabolismo e degradação do tecido conjuntivo, através da alteração no equilíbrio peptidases/antipeptidases (Alfakry *et al.*, 2016; Cavalla *et al.*, 2017; Checchi *et al.*, 2020). Por outro lado, o HOCl pode ativar a pró-MMP-8 e a pró-MMP-9, dependendo do rácio oxidante/enzima (Cavalla *et al.*, 2017; Checchi *et al.*, 2020). Estes mecanismos podem ser compreendidos através da Figura 1.

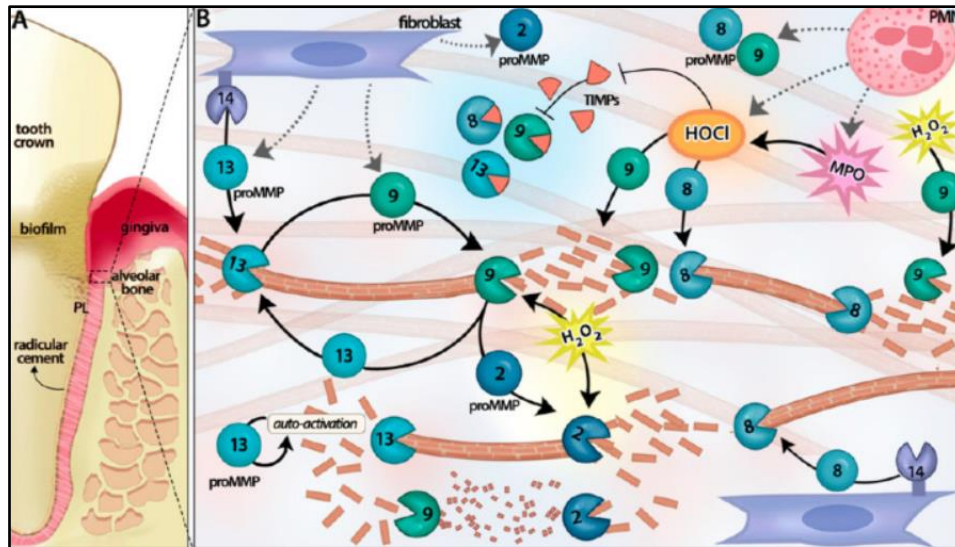


Figura 1 - Cascata de ativação das MMP no catabolismo do tecido conjuntivo durante a periodontite. A - O dente e as suas estruturas de suporte. B – Os círculos completos e parciais, com os respectivos números, representam MMP específicas como pró-enzimas ou como enzimas ativas. As barras castanhas representam as fibras de colágeno. A membrana é delimitada pela MMP-14 que ativa a pró-MMP-13 para degradar colágeno tipo I, constituinte principal da MEC do ligamento periodontal, cimento radicular e osso alveolar. A MMP-13 ativa a pró-MMP-9, que por sua vez pode ativar a pró-MMP-2 e a pró-MMP-13. A MMP-2 e a MMP-9 processam posteriormente a gelatina resultante da atividade da collagenase. A MMP-13 pode sofrer autoativação por autoproteólise. As espécies reativas de O_2 , como HOCl e H_2O_2 , provenientes de fagócitos, também podem modificar o equilíbrio de peptidases/antipeptidases, ativando pró-MMP e inativando TIMP e MPO (Adaptado de Checchi *et al.*, 2020).

Checchi *et al.* (2020), num artigo de revisão sobre o papel desempenhado pelas MMP na instalação da doença periodontal, mostraram que ao longo dos últimos anos várias MMP têm apresentado envolvimento na degradação dos tecidos periodontais, sendo que as mais comumente encontradas no FCG são a MMP-8 e a MMP-9. A presença da MMP-8 é a mais relatada em casos de periodontite, representando cerca de 80% das collagenases identificadas no fluido. Na sua forma ativa, é a principal collagenase derivada de neutrófilos responsável pela degradação do colágeno gengival e ligamentar e destruição dos tecidos periodontais. Por outro lado, a MMP-9 é presumivelmente a gelatinase com maior envolvimento no processo de reabsorção óssea. Os autores destacaram que estes dados provêm de estudos que têm procurado comparar os níveis de MMP-8 e de MMP-9 em pacientes com saúde periodontal, gengivite e periodontite, para apurar se estas enzimas podem atuar como biomarcadores da doença. Nos pacientes periodontais têm sido encontrados níveis mais elevados de MMP-8 e de MMP-9 nos fluidos orais.

Para além destas, outras MMP podem atuar no desenvolvimento da doença periodontal, no entanto estes dados carecem de mais estudos de investigação.

A ação das MMP sobre o desenvolvimento da doença é presumível, e tendo em conta que apenas a sua forma ativa é cataliticamente apta para atuar de forma destrutiva, tem sido sugerido que terapias inibidoras da sua ação podem constituir potenciais estratégias para tratar e melhorar o prognóstico da periodontite.

3.5. Atuação como Reguladores da Doença Periodontal

Para além da sua ação proteolítica, as MMP regulam o processo de inflamação periodontal. Durante a progressão da doença, podem ser ativadas em cascatas independentes ou cooperativas (Hernández Ríos *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2010; Buduneli & Kinane, 2011; Cavalla *et al.*, 2017) e da sua ação resultam funções anti ou pró-inflamatórias, que levam, respetivamente, à homeostase ou à patologia dos tecidos periodontais (Cavalla *et al.*, 2017).

Existe evidência em como as MMP ativas podem processar e regular a biodisponibilidade e/ou funções biológicas de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento com envolvimento na doença periodontal (Van Den Steen *et al.*, 2003; Van Lint *et al.*, 2005; Tester *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008; Korpi *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2011; Cavalla *et al.*, 2017). As citocinas modelam a resposta celular durante a inflamação periodontal, e quando se acoplam aos seus recetores em células alvo, viabilizam a sinalização intracelular e modificam a expressão genética. Do mesmo modo, as quimiocinas induzem o tráfego regulado de vários tipos de células específicas para os tecidos inflamados (Da Costa *et al.*, 2015; Cavalla *et al.*, 2017). A abundância relativa e o balanço de citocinas/quimiocinas são os responsáveis finais pelas alterações tecidulares durante a progressão da periodontite, sendo que o último pode determinar o caráter, intensidade e duração da resposta gerada pelo hospedeiro (Cavalla *et al.*, 2014; Stadler *et al.*, 2016; Cavalla *et al.*, 2017). A Figura 2 representa o modo como as MMP podem regular a inflamação e destruição periodontal.

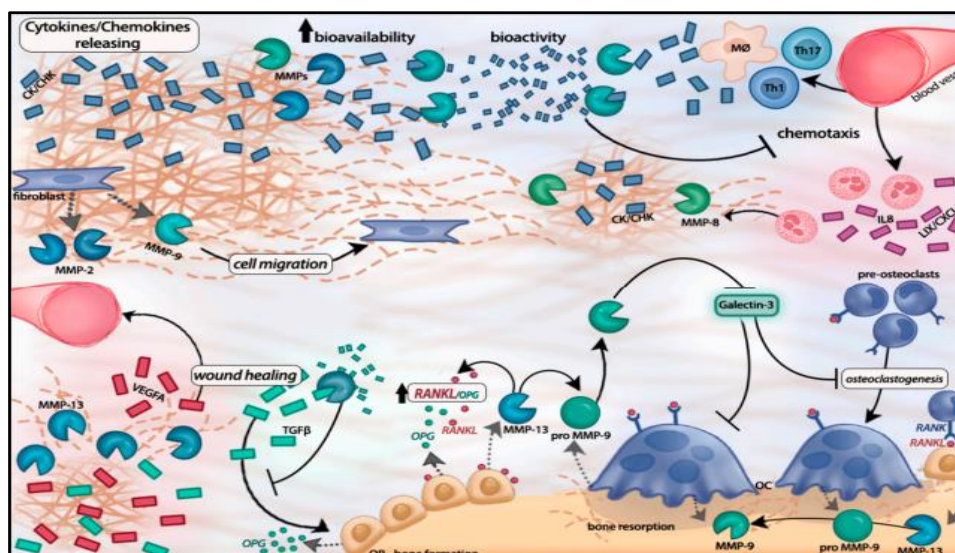


Figura 2 - Regulação da inflamação e destruição periodontal pelas MMP. CK/CC - Citocinas/Quimiocinas; OB - Osteoblastos; OC - Osteoclastos; MØ - Macrófagos; Th - Linfócitos T Auxiliares CD4 +. As MMP libertam CK/CC da MEC, aumentando a sua biodisponibilidade e modificando a sua bioatividade. Por outro lado, as MMP também podem clivar CK/CC, gerando produtos incompletos que podem atuar como antagonistas competitivos. A abundância relativa de CK/CC favorece a infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos Th1/Th17, determinantes na destruição inflamatória dos tecidos periodontais. As MMP podem regular a cicatrização de lesões, libertando fatores angiogênicos - como o VEGFA - da MEC ou por meio da modificação da sinalização do fator de crescimento transformador - TGF-β1. As MMP também regulam a reabsorção óssea: a MMP-13 ativa a pró-MMP-9 secretada por OC, que por sua vez inativa a galectina-3 - inibidora da osteoclastogênese - e favorece o ligante do receptor ativador do fator nuclear κB – RANKL e a sinalização de TGF-β1 (Adaptado de Cavalla *et al.*, 2017).

Há cada vez mais evidências em como as MMP são preponderantes no desenvolvimento da doença periodontal, desde a sua atividade proteolítica até à regulação e modulação de funções biológicas moleculares envolvidas no desenvolvimento da doença. É possível presumir que a MMP-8 e a MMP-9 são as MMP de maior relevância clínica, pois são as mais frequentemente relatadas nos tecidos periodontais como reflexo da gravidade e progressão da doença, bem como da resposta à terapêutica por parte do hospedeiro. No entanto, o conhecimento atual sobre a complexidade do processo de envolvimento das MMP com a doença periodontal está longe de ser concluído.

Deste modo, o principal objetivo deste estudo piloto consiste em avaliar a presença de MMP ativas no FCG de pacientes com doença periodontal por comparação a pacientes com saúde periodontal, a fim de determinar se estas enzimas podem atuar como biomarcadores da doença.

II. METODOLOGIA

1. Considerações Gerais

Este estudo de investigação aplicada, designado por “As Metaloproteínases como Biomarcadores da Doença Periodontal - Estudo Piloto”, está integrado no projeto científico aprovado e financiado pelo programa Egas Moniz/CiiEM investiga “Relationship between metalloproteinases 8 and 9 promoter gene polymorphisms, protein activity and periodontitis susceptibility in a Portuguese population”, do Investigador Principal Madalena Oom, associado do CiiEM.

O estudo foi aprovado pela Comissão Científica do MIMD/Comissão de Ética do IUEM (Processo Interno Nº 922) e autorizado pela Direção da Clínica Dentária Egas Moniz (CDEM) para o acesso aos dados clínicos dos pacientes, bem como para a recolha de amostras para fins de investigação, tendo decorrido na clínica universitária e nos laboratórios deste instituto entre os meses de fevereiro e julho de 2021.

2. Seleção dos Participantes com Critérios de Inclusão e Exclusão

Os participantes do estudo foram selecionados por conveniência a partir dos pacientes referenciados para a consulta de Triagem ou de Periodontologia da CDEM, segundo critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos. Foram incluídos no estudo pacientes adultos, com saúde periodontal - para integrar o grupo de controlo - e com periodontite - para integrar o grupo de estudo. Foram excluídos pacientes em período de gestação ou em período de amamentação, pacientes portadores de aparelho ortodôntico, pacientes submetidos a tratamento periodontal há menos de seis meses e pacientes com perda ponderal (cancro e/ou doença inflamatória crónica).

Previamente ao começo da fase experimental, todos os participantes foram devidamente informados e esclarecidos, mediante comunicação verbal, dos objetivos e procedimentos necessários à realização do estudo e à confidencialidade de todas as informações recolhidas. A aceitação da participação voluntária converteu-se na assinatura do Termo de Consentimento Informado (Anexo 1).

Todos os dados apurados permanecem confidenciais e estão acessíveis única e exclusivamente aos investigadores com envolvimento direto no projeto.

3. Avaliação Periodontal dos Participantes

Para aferição do seu estado periodontal, os participantes do estudo foram submetidos a avaliação clínica através do preenchimento do periodontograma (Anexo 2), com recurso a um *kit* básico e a uma sonda periodontal graduada CP-12. Para cada elemento dentário foram analisados parâmetros clínicos como índice de placa, índice gengival, profundidade de sondagem, hemorragia à sondagem, nível da margem gengival, mobilidade dentária e presença de lesão de furca (quando aplicável). A definição de caso de periodontite foi definida de acordo com a Academia Americana de Periodontologia e a Federação Europeia de Periodontologia (Tonetti *et al.*, 2018).

Alguns participantes foram adicionalmente submetidos a avaliação radiográfica, através da realização do status radiográfico composto por radiografias apicais, com a utilização de paralelizadores radiográficos anteriores e posteriores.

Para confirmação dos critérios de inclusão foi consultada a ficha clínica dos participantes, realizada a avaliação periodontal (na ausência da avaliação radiográfica foi considerada apenas a avaliação clínica) e aplicado um questionário de recolha e registo de dados (Anexo 3).

4. Recolha e Quantificação de Amostras de Fluido Crevicular Gengival

A recolha e a quantificação de amostras de FCG foram realizadas utilizando metodologias amplamente reconhecidas (revistas por Wassall e Preshaw (2016)). Foram introduzidos Periopapers (Oraflow, Inc.[®]) em localizações dentárias selecionadas e medidos os respetivos volumes de FCG no Periotron (Oraflow, Inc.[®]).

Para a recolha do fluido foram escolhidas duas localizações em cada participante, correspondentes a sulcos gengivais nos pacientes incluídos no grupo de controlo e a bolsas periodontais nos pacientes incluídos no grupo de estudo.

Posteriormente, procedeu-se à remoção da saliva por meio do isolamento dos locais de recolha das amostras com rolos de algodão e aplicação de jato de ar suave, e à remoção da placa dentária supragengival visível com bolas de algodão esterilizadas.

O Periopaper foi introduzido até que uma leve resistência fosse sentida, não excedendo 1-2 mm de profundidade durante 30 s (Figura 3). As amostras em que se suspeitou ou verificou contaminação salivar ou hemorrágica foram descartadas.

De seguida, o Periopaper foi rapidamente transferido para o Periotron (previamente calibrado) para determinação do volume de fluido recolhido (Figura 3), colocado no Tubo Eppendorf codificado, armazenado em gelo e transportado de imediato até à câmara a -80 °C onde permaneceu até à sua análise em laboratório.

O Periotron foi ajustado ao valor zero usando um Periopaper sem qualquer adição e desinfetado com álcool etílico a 70% após a quantificação de cada amostra, de modo a minimizar o risco de leituras cruzadas entre pacientes.



Figura 3 - Método de recolha e quantificação de FCG com recurso ao Periopaper (à esquerda) e ao Periotron (à direita).

Os parâmetros clínicos para preenchimento do periodontograma foram aferidos, no mínimo, com uma semana de antecedência ao dia da recolha de FCG, pois a manipulação dos tecidos gengivais com uma sonda periodontal imediatamente antes da recolha do fluido poderia provocar hemorragia e contaminação das amostras, e, por outro lado, o risco de flutuações volumétricas por estimulação mecânica.

Os valores gerados pelo Periotron em unidade arbitrária (UA) podem ser

interpretados como uma medida do grau de inflamação dos tecidos gengivais (Bathla, 2017). Segundo o autor, valores compreendidos entre 0-20 indicam que os tecidos gengivais se apresentam saudáveis; entre 21 a 40 com inflamação leve; entre 41 a 80 com inflamação moderada; e entre 81 a 200 com inflamação severa.

O Periotron foi calibrado segundo as instruções do fabricante. Na calibração foi utilizado soro de cavalo para mimetizar o mais possível o FCG humano. Os valores obtidos, em triplicado, foram ajustados a uma equação polinomial de 4º grau conforme indicação do fabricante (Figura 4).

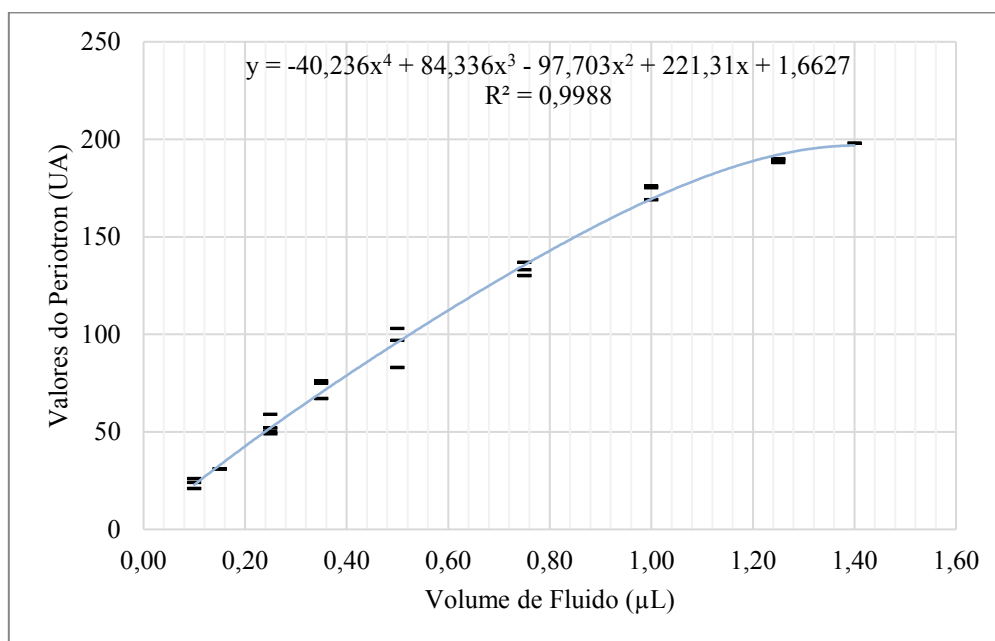


Figura 4 - Curva de calibração do Periotron.

Para determinar o volume de FCG, os valores quantificados pelo Periotron em UA foram convertidos para valores de volume em µL, por referência à curva de calibração.

5. Análise da Atividade das Metaloproteínas por Zimografia

A) Preparação dos Géis

Para a execução da zimografia foram preparados géis de poliacrilamida constituídos por duas fases, a de concentração a 4% acrilamida e a de resolução a 10%

acrilamida (Bio-Rad®). Isto permitiu que as MMP contidas nas amostras de FCG colocadas em cada poço fossem concentradas antes da separação, aumentando a sua resolução. A fase de resolução em cada gel foi preparada com incorporação de 0,5 mg/ml de colagénio (Collagen, Type I solution from rat tail, Sigma-Aldrich®), substrato das collagenases (MMP referenciadas com um maior grau de envolvimento com a doença periodontal).

B) Preparação das Amostras

As amostras recolhidas por meio de Periopapers descongelaram em gelo, foram diluídas em tampão fosfato salino (PBS) estéril, centrifugadas, diluídas com tampão de amostra não redutor e aplicadas nos géis. Em cada gel foi também colocado um marcador de massa molecular (NZYColour Protein Marker I, NZYTech®). Para controlo interno foi utilizada a MMP-8 (MMP-8, Human Neutrophil, Sigma-Aldrich®) após ativação com acetato de p-aminofenilmercúrico (Sigma-Aldrich®) a 37 °C por 1 h.

C) Zimografia

A eletroforese decorreu por 15 min a 80 V e por, aproximadamente, 2 h a 180 V em tampão Tris/Glicina/SDS (Bio-Rad®). Após o seu término, os géis foram retirados do sistema de eletroforese (Bio-Rad®) e lavados por duas vezes, durante 30 min, com agitação suave em soluções aquosas contendo 2,5% do detergente não iónico Triton X-100 para remoção do dodecil sulfato de sódio (SDS) e renaturação das enzimas. De seguida, os géis foram incubados em condições ótimas para digestão do colagénio em soluções de incubação contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM ZnCl₂ e 0,02% Brij 35 a 37 °C, durante períodos de tempo variáveis. Após incubação, os géis foram corados com soluções de azul brilhante Coomassie Blue R-250 (Bio-Rad®) por 1 h e descorados em soluções de descoloração (Bio-Rad®) igualmente por 1 h, até serem visíveis áreas de atividade proteolítica, ou seja, bandas incolores em contraste com o fundo azul dos géis.

D) Análise dos Géis

Os géis foram analisados por densitometria através do programa informático ImageJ, após serem fotografados. A massa molecular das bandas foi calculada por comparação com as bandas do marcador a partir da curva de calibração correspondente (exemplo no Anexo 4).

III. RESULTADOS

1. Caracterização da Amostra Populacional

A amostra do estudo foi constituída por 10 participantes distribuídos por dois grupos: o grupo de controlo e o grupo de estudo. O grupo de controlo incluiu cinco pacientes com saúde periodontal, entre os quais dois pacientes do sexo masculino e três do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 22 e os 60 anos. O grupo de estudo incluiu cinco pacientes com periodontite, entre os quais um paciente do sexo masculino e quatro do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 20 e os 67 anos.

2. Análise Volumétrica das Amostras Recolhidas

Em cada participante foram seleccionadas duas localizações dentárias para recolha e quantificação de FCG, correspondentes a sulcos gengivais nos pacientes do grupo de controlo - profundidade de sondagem menor ou igual a 3 mm - (Tabela 2) e a bolsas periodontais nos pacientes do grupo de estudo - profundidade de sondagem superior a 3 mm - (Tabela 3). Os dois grupos foram posteriormente comparados por referência aos resultados obtidos (Figura 5).

Tabela 2 - Resultados da recolha e quantificação de FCG no grupo de controlo.

Grupo de Controlo								
Idade	Sexo	Diagnóstico Periodontal	Amostra	Dente	Localização	Profundidade de Sondagem (mm)	Volume de FCG (UA) (µL)	
31	F	Saúde Periodontal	C.1A	11	MV	3	30	0,13
			C.1B	21	MV	3	16	0,08
60	F	Saúde Periodontal	C.2A	11	MV	1	1	0,02
			C.2B	21	MV	1	6	0,04
36	M	Saúde Periodontal	C.3A	11	MV	3	28	0,13
			C.3B	21	MV	3	45	0,21
22	F	Saúde Periodontal	C.4A	11	MV	2	17	0,08
			C.4B	21	MV	2	53	0,25
55	M	Saúde Periodontal	C.5A	11	MV	3	44	0,20
			C.5B	21	MV	3	24	0,11

F – Feminino; M – Masculino; MV – Mesio-Vestibular; UA – Unidade Arbitrária.

Tabela 3 - Resultados da recolha e quantificação de FCG no grupo de estudo.

Grupo de Estudo								
Idade	Sexo	Diagnóstico Periodontal	Amostra	Dente	Localização	Profundidade de Sondagem (mm)	Volume de FCG (UA) (µL)	
47	F	Periodontite IV/C	E.1A	27	MV	7	Er	-
			E.1B	37	CL	7	198	1,40
20	F	Periodontite IV/C	E.2A	11	MV	8	104	0,56
			E.2B	11	DV	10	Er	-
20	F	Periodontite III/C	E.3A	43	MV	6	182	1,08
			E.3B	42	DV	6	125	0,69
47	F	Periodontite III/C	E.4A	25	DV	6	103	0,56
			E.4B	27	MV	6	162	0,92
67	M	Periodontite IV/B	E.5A	16	DP	9	172	0,99
			E.5B	16	CP	6	183	1,09

F – Feminino; M – Masculino; MV – Mesio-Vestibular; CL – Centro-Lingual; DV – Disto-Vestibular; DP – Disto-Palatino; CP – Centro-Palatino; UA – Unidade Arbitrária; Er – Erro.

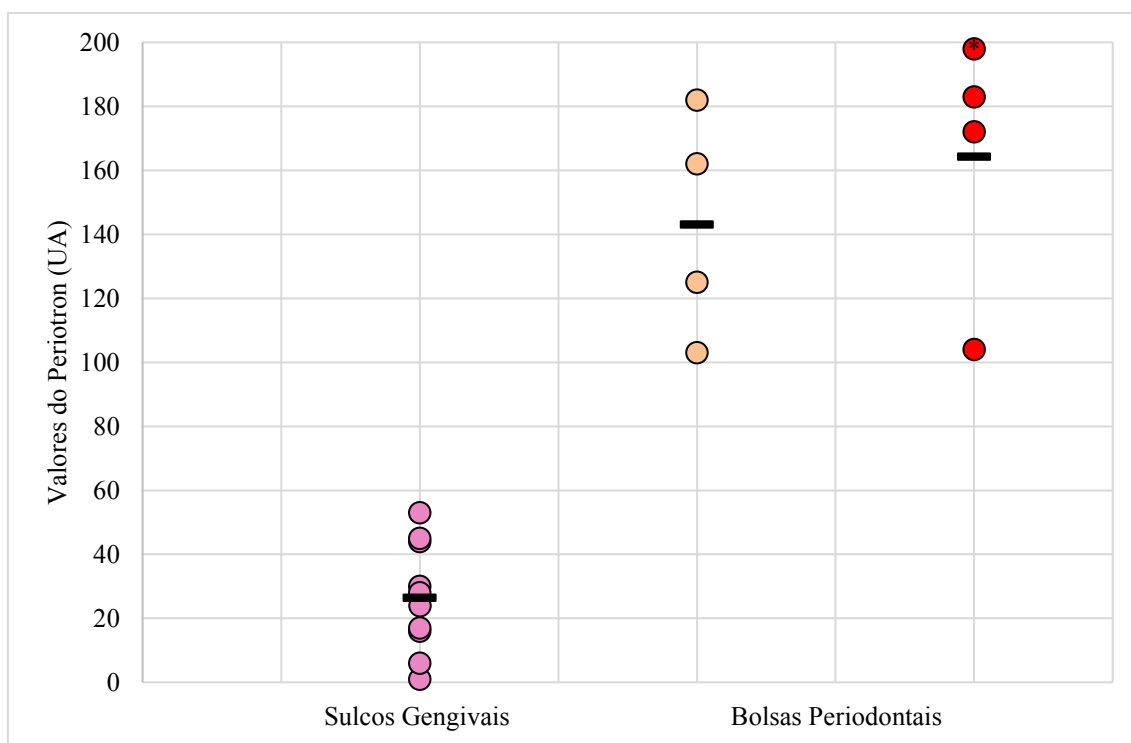


Figura 5 - Volumes de FCG quantificados pelo Periotron. Os círculos cor de rosa representam as medições em sulcos gengivais do grupo de controlo e os círculos cor de laranja e vermelhos representam as medições em bolsas periodontais do grupo de estudo (em pacientes com periodontite classificada como estadio III e IV, respetivamente). As barras pretas representam a média de volumes medidos. O símbolo * representa as medições das amostras E.1A e E.2B, superiores aos valores gerados pelo Periotron.

Por comparação, o volume médio de FCG é superior em bolsas periodontais, 154 ± 38 ($n=8$), do que em sulcos gengivais, 26 ± 17 ($n=10$). Dentro do grupo de estudo, foram encontradas diferenças no volume de FCG recolhido em bolsas correspondentes a pacientes com periodontite severa (estadio III), 143 ± 36 ($n=4$), e avançada (estadio IV), 164 ± 42 ($n=4$). Note-se que quantidades volumétricas acima da escala numérica gerada pelo Periotron impediram a leitura do volume das amostras E.1A e E.2B, correspondentes a bolsas periodontais de pacientes com periodontite avançada.

3. Análise da Atividade Proteolítica das Amostras Recolhidas

Para análise da atividade proteolítica das MMP presentes no FCG foi utilizada a técnica de zimografia, que consistiu na separação das enzimas da amostra por eletroforese

desnaturante em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) polimerizados na presença de colagénio. Este tipo de eletroforese permite a separação de proteínas com base na sua massa molecular. A presença do colagénio permitirá evidenciar a atividade das MMP.

Antes da análise do FCG foi realizado um gel de calibração para a MMP-8 para permitir a quantificação da sua presença nas amostras e ser usada como controlo interno nos géis (Figura 6). Este gel contém oito poços onde foram colocadas quantidades crescentes de MMP-8. Na Figura 6 vê-se, entre 63 e 75 kDa, uma banda clara como resultado da atividade da MMP-8, num fundo escuro correspondente à coloração do colagénio não degradado pelo azul de Coomassie. A partir da intensidade das bandas foi possível obter o gráfico da Figura 7.

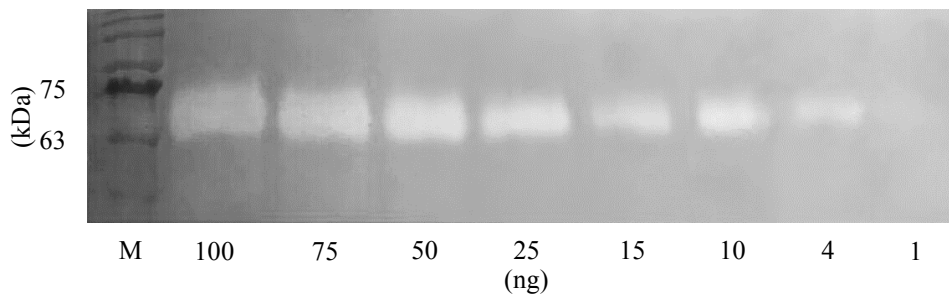


Figura 6 - Gel de calibração para identificação e quantificação da enzima MMP-8.

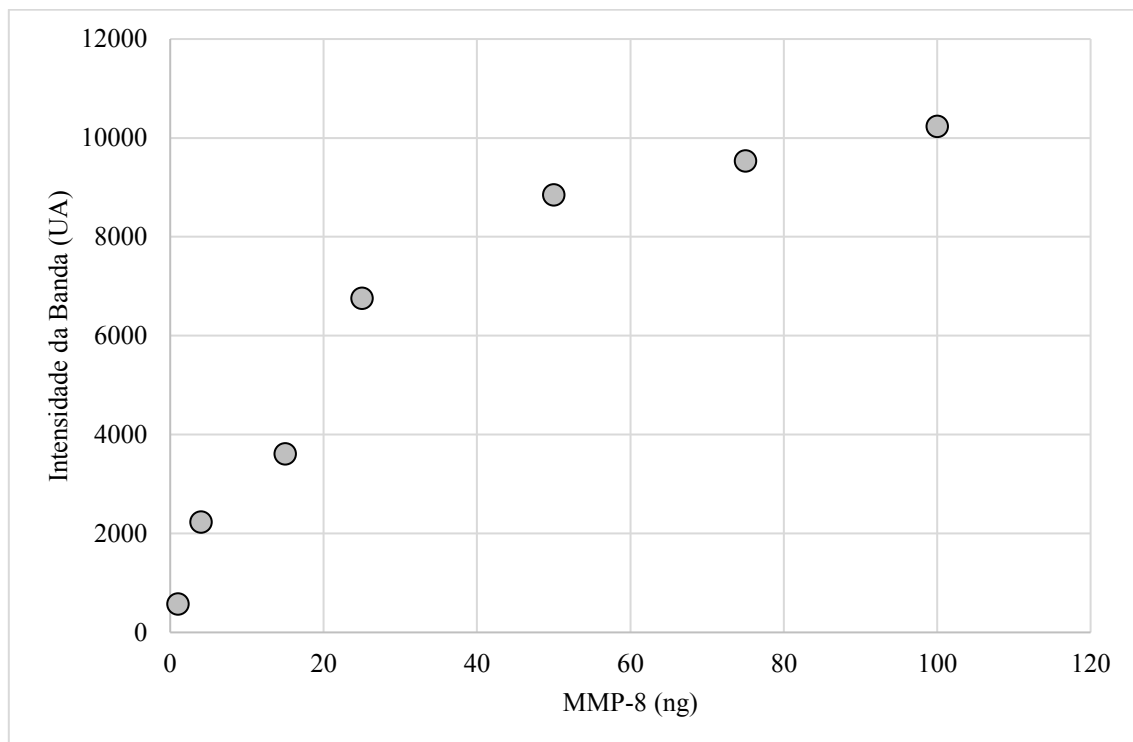


Figura 7 - Curva de calibração da enzima MMP-8.

A Figura 7 mostra que nestas condições é possível quantificar a MMP-8 até 30 ng, pois para quantidades superiores ocorre saturação.

Numa primeira abordagem foi testada a preparação da amostra de FCG a colocar no gel. Foram testados vários métodos, como a colocação direta do Periopaper no poço do gel, a incubação do Periopaper em tampão de amostra não redutor e colocação da totalidade da amostra ou de uma diluição da amostra no gel, e também a extração da amostra do Periopaper por incubação em tampão PBS estéril por 5 min em gelo, seguido de centrifugação a 10 000 rpm por 2 min. Este último método foi selecionado por ser aquele que permitiu obter melhores resultados.

Para iniciar o projeto, foram selecionadas 10 das 20 amostras recolhidas, cinco do grupo de controlo e cinco do grupo de estudo.

Foram investigadas as seguintes amostras:

- Grupo de Controlo – C.1A, C.2A, C.3A, C.4A e C.5A (Figura 8 e 10).
- Grupo de Estudo – E.1A, E.2A, E.3A, E.4A e E.5A (Figura 9 e 11).

As amostras recuperadas dos Periopapers foram diluídas cerca de 250x em PBS estéril, mas de acordo com o volume medido no Periotron, de forma a que as amostras pudessem ser diretamente comparadas.

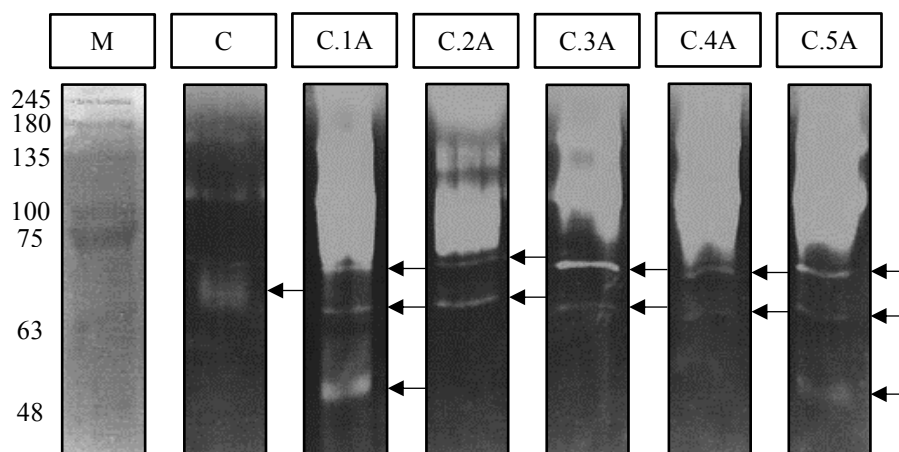


Figura 8 - Gel de eletroforese com amostras do grupo de controlo incubado por 19 h. M corresponde ao marcador de massa molecular e C ao controlo com MMP-8. As setas indicam as bandas de atividade proteolítica.

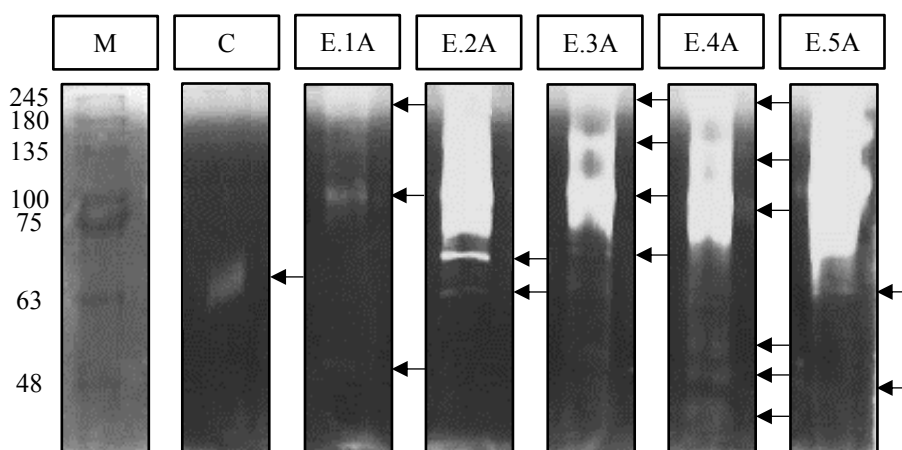


Figura 9 - Gel de eletroforese com amostras do grupo de estudo incubado por 19 h. M corresponde ao marcador de massa molecular e C ao controlo com MMP-8. As setas indicam as bandas de atividade proteolítica.

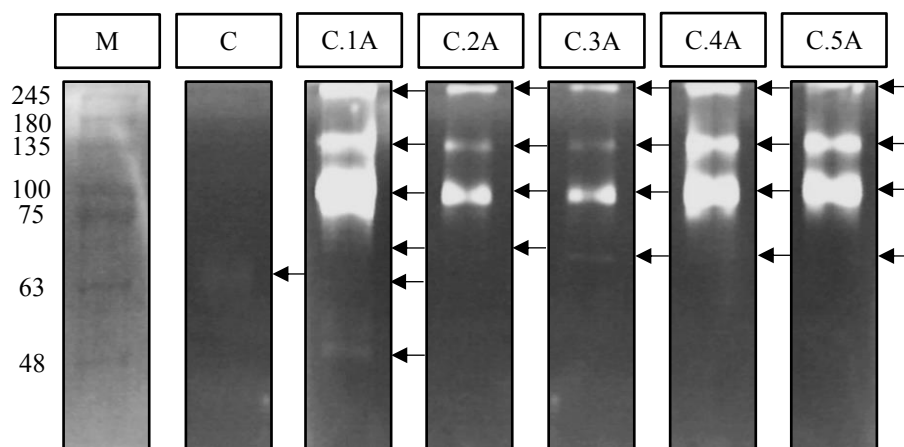


Figura 10 - Gel de eletroforese com amostras do grupo de controlo incubado por 6 h. M corresponde ao marcador de massa molecular e C ao controlo com MMP-8. As setas indicam as bandas de atividade proteolítica.

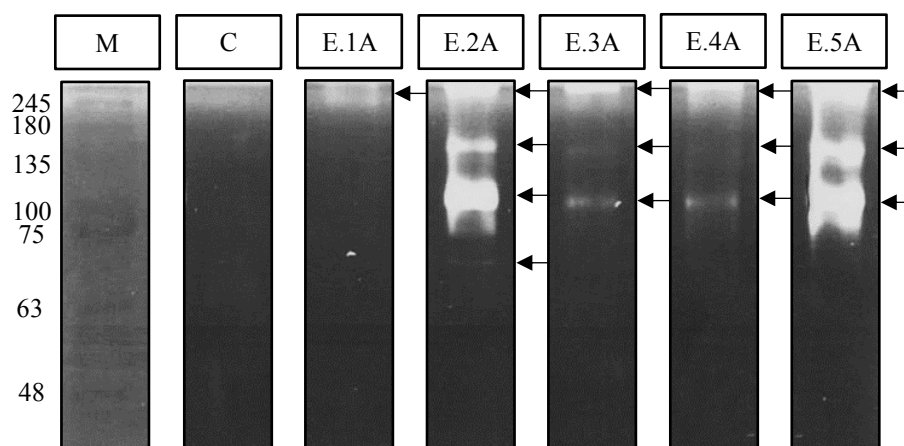


Figura 11 - Gel de eletroforese com amostras do grupo de estudo incubado por 6 h. M corresponde ao marcador de massa molecular e C ao controlo com MMP-8. As setas indicam as bandas de atividade proteolítica.

Inicialmente, e com base no gel em que foi usada a MMP-8, foi experimentada a incubação dos géis por um período longo para tornar mais visíveis as bandas de digestão do colagénio (19 h). Nestes géis (Figura 8 e 9) surge uma larga mancha de colagénio digerido, não sendo possível observar bandas discretas. Assim, para tentar melhorar a resolução foram realizados outros géis, usando as mesmas amostras diluídas, incubados por um período mais curto (6 h). Embora nestes géis (Figura 10 e 11) se consigam distinguir bandas de maior massa molecular, as bandas mais pequenas e menos intensas deixam de ser observadas.

Ao comparar as amostras de controlo e de estudo nos géis de incubação mais longa, verificamos que entre as localizações saudáveis são detetáveis duas bandas em todas as amostras (70 ± 1 kDa e 65 ± 1 kDa) e uma terceira visível apenas em duas amostras ($48 \pm 0,7$ kDa). Também observamos alguma diferença nas intensidades relativas das bandas dentro da mesma amostra. Pelo contrário, estas bandas são, de uma forma geral, não visíveis nas localizações patológicas. Nestas amostras, embora muito ténues, parecem surgir várias bandas de menor massa molecular.

Nos géis de incubação mais curta, verificamos que entre as localizações saudáveis são detetáveis três bandas com diferentes intensidades (> 245 kDa, $140 \pm 4,4$ kDa e $100 \pm 2,2$ kDa). Estas são bandas muito largas que poderão incluir várias proteínas não resolvidas. O mesmo se observa nas localizações patológicas. De modo geral, as bandas parecem menos intensas nas amostras correspondentes a localizações patológicas. As bandas mais intensas e de maior massa molecular não se distinguem quando os géis são incubados por um período mais longo.

As bandas do controlo interno MMP-8 podem ter massa molecular que varia entre 44 kDa (forma ativa) e 58 kDa (pró-forma não ativa). Estes dois tamanhos podem variar devido a graus de glicosilação (Inanc *et al.*, 2017) que dão tamanhos diferentes às amostras. Embora, aparentemente, nenhuma das bandas das amostras investigadas pareça coincidir com as bandas do controlo, estas são alargadas, podendo conter mais do que uma banda de tamanhos muito próximos e que não estão resolvidas nos géis.

IV. DISCUSSÃO

Este estudo foi iniciado pela investigação do FCG como um meio de diagnóstico para a doença periodontal, por intervenção de 10 participantes selecionados por conveniência, distribuídos por dois grupos consoante apresentação de saúde periodontal - grupo de controlo - ou de periodontite - grupo de estudo. Os grupos foram comparados com base no volume médio de fluido estimado para as localizações dentárias selecionadas, correspondentes a sulcos gengivais no grupo de controlo e a bolsas periodontais no grupo de estudo.

Para a recolha de FCG foi adotado o método de introdução de Periopapers nos locais selecionados por este ser de fácil aplicação e minimamente invasivo, amplamente reconhecido e testado (Wassall & Preshaw, 2016; Saito *et al.*, 2017). O Periotron foi posteriormente utilizado para medir os volumes de FCG recolhidos. Este aparelho gera medições quantitativas e objetivas para cada localização, que podem ser utilizadas para fins de diagnóstico periodontal (Sehdev *et al.*, 2017).

Os resultados do nosso estudo mostram que as ponderações obtidas pelo Periotron foram ao encontro das avaliações clínicas e radiográficas realizadas, uma vez que a quantidade de fluido em bolsas periodontais foi superior em relação a sulcos gengivais. Os valores obtidos foram convenientemente enquadrados na escala do Periotron, que determina, em proporcionalidade, o nível de inflamação dos tecidos periodontais. O grupo de estudo apresentou, para locais com doença, um valor volumétrico médio de 154 ± 38 (n=8), que se enquadra no intervalo de valores ponderado pela escala do Periotron como espelho da inflamação severa apresentada por estes pacientes. Contrariamente, o grupo de controlo apresentou, para locais com saúde, um valor volumétrico médio de 26 ± 17 (n=10), ligeiramente acima do intervalo de valores ponderado como reflexo de saúde gengival. Todavia, as oscilações volumétricas apresentadas neste grupo podem ser explicadas por alguns fatores inerentes aos participantes. De modo a minimizar o viés provocado pelo período circadiano, em que o fluido aumenta das 6 às 10 h da manhã e depois diminui (Bathla, 2017; Khurshid *et al.*, 2017; Subbarao *et al.*, 2019), as medições de FCG foram realizadas no mesmo período, durante a tarde (das 15 às 19 h). O estabelecimento de um horário padronizado visou eliminar o possível efeito das variações do horário diurno; no entanto, os restantes fatores, como estimulação mecânica, hábitos tabágicos e alterações hormonais em pacientes jovens do sexo feminino (Bathla, 2017;

Khurshid *et al.*, 2017; Subbarao *et al.*, 2019), não foram controlados, e poderão ter tido efeito nos valores obtidos para ambos os grupos.

No âmbito das diferenças encontradas por comparação volumétrica de FCG entre localizações saudáveis e patológicas, a literatura apoia os resultados obtidos por este estudo. Uma investigação conduzida por Bevilacqua *et al.* (2016) mostrou resultados idênticos e concluiu que os tecidos periodontais patológicos produziram maior quantidade de fluido do que os saudáveis. No entanto, os autores categorizaram os grupos comparativos no mesmo paciente na tentativa de minimizar o erro decorrente da variabilidade interpaciente por referência a estudos anteriores, como a investigação realizada por Bhardwaj e Prabhuji (2013), em que não foi garantida a ausência de variância entre pacientes dos grupos estudados. Os mesmos resultados e as mesmas conclusões foram obtidos por Sehdev *et al.* (2017). Todavia, estes autores consideraram de igual modo as possíveis variações volumétricas entre pacientes e selecionaram, pelo menos, quatro locais para recolha de amostras em cada paciente, correspondentes a locais com saúde e doença.

Especificamente em relação a condições de periodontite, é de realçar que existe um efeito heterogéneo entre os pacientes e as bolsas periodontais que apresentam, sendo que cada uma constitui um ambiente irregular caracterizado por padrões estruturais, histológicos e microbiológicos únicos. Apesar disso, é possível afirmar de forma unânime que o volume de FCG aumenta com a presença de lesões inflamatórias ativas e não com as estruturas histológicas das localizações dentárias, e que as bolsas com maior profundidade de sondagem não são necessariamente as mais inflamadas (Bevilacqua *et al.*, 2016). No nosso estudo, é possível afirmar que a determinação volumétrica de FCG proveniente de locais com saúde e doença periodontal com recurso a Periopapers e ao Periotron constituiu um método de diagnóstico periodontal fiável, coincidindo com a avaliação clínica realizada.

Para além da análise do volume de FCG, também foi utilizada uma abordagem experimental para a análise da atividade proteolítica das MMP no fluido. Múltiplos estudos de investigação destacaram a ação da MMP-8 e da MMP-9 como biomarcadores da doença periodontal nos fluidos orais (Chibebe *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2015; Cavalla *et al.*, 2017; Al-Majid *et al.*, 2018; Checchi *et al.*, 2020), pela pesquisa destas enzimas com recurso a diferentes métodos, separadas ou associadas no FCG e na saliva. Estudos

recentes têm-se dedicado, na sua maioria, à pesquisa de collagenases com menor foco em gelatinases.

No nosso estudo, as MMP foram investigadas como biomarcadores da doença periodontal, com maior incidência na pesquisa de collagenases, como a MMP-8. Foi utilizada a técnica de zimografia com recurso à inclusão de colagénio para detetar as enzimas de interesse. Genericamente, os resultados evidenciam bandas de grande massa molecular, que podem ser dímeros ou complexos proteicos (Snoek-van Beurden & Von den Hoff, 2005), pois a MMP de maior massa molecular é a gelatinase MMP-9, cuja pró-enzima possui 92 kDa (Bencsik *et al.*, 2017). As formas inativas e ativas das collagenases MMP-1, MMP-8 e MMP-13, têm em geral massas moleculares inferiores a 75 kDa - as formas inativas têm, aproximada e respetivamente, 57, 75 e 65 kDa e as ativas 52, 57 e 48 kDa (Bencsik *et al.*, 2017). Neste sentido, será mais interessante utilizar um período de incubação mais longo que permita evidenciar melhor a atividade das formas enzimáticas ativas inicialmente presentes nas amostras. Podemos pôr as hipóteses, com base na massa molecular, que as bandas de hidrólise de colagénio com cerca de 70 e 65 kDa detetadas nas amostras saudáveis correspondem a formas inativas das collagenases MMP-8 ou MMP-13. Durante o processo de renaturação, as pró-enzimas são ativadas e dão origem à hidrólise do colagénio. A MMP-1 ou MMP-13 poderão estar presentes nas amostras e corresponder às bandas que detetamos com massa molecular com cerca de 48 kDa. Uma vez que as gelatinases MMP-2 e MMP-9 também podem degradar o colagénio tipo I, embora este não seja o seu substrato preferencial (Checchi *et al.*, 2020), será possível atribuir as bandas a formas inativas ou ativas destas MMP.

É de realçar que as MMP podem ser modificadas após a transcrição por glicosilação, o que lhes altera ligeiramente a massa molecular (Boon *et al.*, 2016). Ainda assim, não parece ter sido detetada nenhuma banda correspondente à forma ativa da MMP-8 nas amostras patológicas.

As collagenases estão associadas a uma maior dificuldade de identificação por zimografia, sendo por isso necessária uma incubação por um período superior para detetar a sua presença nas amostras (Snoek-van Beurden & Von den Hoff, 2005). A literatura defende que a duração da incubação deve diferir consoante as MMP investigadas (Tajhya *et al.*, 2017), de modo a obter resultados otimizados e específicos para cada tipo enzimático. A técnica de zimografia tem a vantagem de poder detetar várias MMP nas

suas formas inativas ou ativas mas, por outro lado, quando é realizada de modo isolado, não é a mais adequada para identificar inequivocamente estas enzimas. Mesmo a comparação da migração das MMP com conhecidos controlos de massa molecular não garante a identificação enzimática (Hu & Beeton, 2010). Neste sentido, outros métodos para confirmar a presença e quantificar as MMP nas amostras de FCG poderão ter de ser utilizados. Embora as massas moleculares das MMP sejam conhecidas, para que as identifiquemos de modo fidedigno será necessário recorrer a métodos mais específicos, como a utilização de anticorpos (Fischer & Riedl, 2019).

O aparecimento de bandas tão evidentes e intensas nos géis do grupo de controlo não era previsível, no entanto, no processo de manipulação das MMP, estas podem ter sofrido ativação através da passagem da forma enzimática inativa para ativa (Hu & Beeton, 2010). Assim sendo, no processo de renaturação dos géis as MMP das amostras saudáveis podem ter sido ativadas. Como estas peptidases degradam a matriz extracelular quando ativas e foram descritas como envolvidas em processos patológicos para além da doença periodontal, como distúrbios cerebrais, displasias esqueléticas, osteoartrite, doenças cardiovasculares e desenvolvimento de tumores (Malemud, 2006; Cui *et al.*, 2017), é possível que as bandas que surgem nos controlos saudáveis correspondam a formas inativas destas enzimas. Estas são segregadas para o exterior das células e mantidas inativas por associação com TIMP ou até ativação por várias peptidases, incluindo outras MMP (Cui *et al.*, 2017).

Bildt *et al.* (2008) realizaram um estudo muito semelhante no qual também investigaram a presença de MMP no FCG de pacientes com saúde e doença periodontal. Os autores encontraram grandes quantidades de complexos proteicos de MMP-2 ativas e fragmentos colagenolíticos, com níveis mais elevados no FCG de pacientes com periodontite. Os nossos resultados atuais mostram, de igual modo, a presença de dímeros ou complexos proteicos responsáveis pela acentuada digestão do colagénio, o que resultou em largas bandas colagenolíticas no início dos géis incubados por 19 h. Estas bandas foram observadas em amostras saudáveis e patológicas, todavia, sem diferenças significativas entre os grupos. Isto pode querer dizer que MMP-2 ativas estiveram presentes em todas as amostras do nosso estudo à semelhança dos resultados obtidos por Bildt *et al.* (2008), embora sem diferenças aparentes entre os dois grupos estudados. Os autores mostraram também que no FCG proveniente de localizações patológicas foi

detetado um maior número de MMP, mas surpreendentemente algumas destas enzimas foram mais abundantes em amostras saudáveis. Estes dados vão ao encontro do que encontramos no nosso estudo, especialmente nos géis incubados por 19 h, em que verificámos um maior número de bandas no grupo de estudo, mas uma maior atividade proteolítica no grupo de controlo. Os autores realizaram várias técnicas de pesquisa enzimática, como zimografia com incorporação de colagénio, zimografia com incorporação de gelatina, zimografia reversa e *western blotting*. De modo geral, concluíram que a pró-MMP-2, a pró-MMP-9, a MMP-1 e a MMP-8 estiveram presentes em todas as amostras. No gel com colagénio detetaram bandas com 55 e 43 kDa e bandas mais largas com 30 e 35 kDa. A banda de 55 kDa foi identificada por *western blotting* como a MMP-8 ativa e as bandas de menor massa molecular foram apontadas como possíveis fragmentos da MMP-8, presentes a níveis pouco significativos no FCG. A banda de 43 kDa não foi identificada por *western blotting*, mas segundo os autores corresponde, presumivelmente, à MMP-1 ativa. Não foram encontradas bandas com massas moleculares correspondentes à pró-MMP-1 (58 kDa), à pró-MMP-8 (64 kDa), à pró-MMP-13 (60 kDa) e à MMP-13 ativa (48 kDa) por zimografia ou *western blotting*. Estes resultados reforçam as nossas hipóteses de ter detetado a pró-MMP-8 ou pró-MMP-13 e a MMP-1 ou MMP-13 ativa. Os autores não relataram a presença de bandas específicas com > 245, 140 e 100 kDa que encontramos nos géis incubados por 6 h.

Outros estudos já reportaram também a presença das collagenases MMP-1 e MMP-13 e das gelatinases MMP-2 e MMP-9 ativas em locais saudáveis e patológicos, aumentadas em condições de periodontite (Ejeil *et al.*, 2003; Rai *et al.*, 2010). Por outro lado, os estudos de Mc Crudden *et al.* (2017) e de Kasuma *et al.* (2018) mostraram apenas o aumento de MMP-8 ativa em doentes periodontais.

Os resultados do nosso estudo mostram que as MMP apresentam características propícias à sua referência como biomarcadores da doença periodontal, pois foram verificadas diferenças entre as amostras de pacientes com saúde e doença, mesmo através da análise de um muito pequeno número de amostras. Deste modo, o trabalho de investigação deve continuar analisando um maior conjunto amostral. No entanto, considera-se que para a identificação rigorosa das MMP presentes no FCG são necessários estudos comparativos adicionais que façam uso de métodos de incubação otimizados e complementares à zimografia, como a utilização anticorpos, que

identifiquem especificamente cada tipo de MMP. Estes poderão ser os pontos de partida para os próximos avanços do projeto de investigação no qual este estudo está integrado.

V. CONCLUSÃO

Neste estudo, o FCG foi analisado como meio de diagnóstico para a doença periodontal e aparentou ser promissor para a distinção entre pacientes saudáveis e doentes no âmbito das condições periodontais. É possível afirmar que a determinação volumétrica de FCG proveniente de locais com saúde e doença periodontal com recurso a Periopapers e ao Periotron constituiu um método de diagnóstico periodontal fiável, coincidindo com a avaliação clínica realizada.

A exploração da atividade proteolítica das MMP por zimografia foi igualmente promissora, pois apesar das limitações apresentadas permitiu verificar diferenças entre os dois grupos estudados, o que revela que estas enzimas possuem características auspiciosas como biomarcadores da doença periodontal. No entanto, são necessários estudos adicionais, com métodos de incubação otimizados e recursos complementares, como a utilização de anticorpos, para ser possível identificar com precisão quais as MMP diretamente envolvidas com a doença.

VI. BIBLIOGRAFIA

Academia Americana de Periodontologia. (2015). American Academy of Periodontology Task Force Report on the Update to the 1999 Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 86(7), 835–838.

<https://doi.org/10.1902/jop.2015.157001>

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

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

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>

Almehmadi, A. H., & Alghamdi, F. (2018). Biomarkers of alveolar bone resorption in gingival crevicular fluid: A systematic review. *Archives of Oral Biology*, 93, 12–21.

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.05.004>

Amano, A. (2010). Bacterial adhesins to host components in periodontitis. *Periodontology 2000*, 52(1), 12–37.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00307.x>

Barros, S. P., Williams, R., Offenbacher, S., & Morelli, T. (2016). Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontology 2000*, 70(1), 53-64.

<https://doi.org/10.1111/prd.12107>

Bathla, S. (2017). *Textbook of Periodontics* (1st ed.). J. P. Medical Ltd.

- Bencsik, P., Bartekova, M., Görbe, A., Kiss, K., Pálóczi, J., Radosinska, J., Szűcs, G., & Ferdinandy, P. (2017). MMP Activity Detection in Zymograms. *Methods in Molecular Biology*, 1626, 53-70.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4_6
- Benjamin, M. M., & Khalil, R. A. (2012). Matrix Metalloproteinase Inhibitors as Investigative Tools in the Pathogenesis and Management of Vascular Disease. *Experientia Supplementum*, 103, 209–279.
https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0364-9_7
- Bevilacqua, L., Biasi, M. D., Lorenzon, M. G., Frattini, C., & Angerame, D. (2016). Volumetric Analysis of Gingival Crevicular Fluid and Peri-Implant Sulcus Fluid in Healthy and Diseased Sites: A Cross-Sectional Split-Mouth Pilot Study. *The Open Dentistry Journal*, 10, 131-138.
<https://doi.org/10.2174/1874210601610010131>
- Bhardwaj, S., & Prabhuji, M. L. V. (2013). Comparative volumetric and clinical evaluation of peri-implant sulcular fluid and gingival crevicular fluid. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 43(5), 233-242.
<https://doi.org/10.5051/jpis.2013.43.5.233>
- Bildt, M. M., Bloemen, M., Kuijpers-Jagtman, A. M., & Von den Hoff, J. W. (2008). Collagenolytic Fragments and Active Gelatinase Complexes in Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 79(9), 1704-1711.
<https://doi.org/10.1902/jop.2008.080021>
- Boelen, G. J., Boute, L., d'Hoop, J., EzEldeen, M., Lambrichts, I., & Opdenakker, G. (2019). Matrix metalloproteinases and inhibitors in dentistry. *Clinical Oral Investigations*, 23, 2823–2835.
<https://doi.org/10.1007/s00784-019-02915-y>
- Boon, L., Ugarte-Berzal, E., Vandooren, J., & Opdenakker, G. (2016). Glycosylation of matrix metalloproteases and tissue inhibitors: present state, challenges and opportunities. *The Biochemical Journal*, 473(11), 1471-1482.

<https://doi.org/10.1042/BJ20151154>

Botelho, J., Machado, V., Proença, L., Alves, R., Cavacas, M. A., Amaro, L., & Mendes, J. J. (2019). Study of Periodontal Health in Almada-Seixal (SoPHiAS): a cross-sectional study in the Lisbon Metropolitan Area. *Scientific Reports*, 9(1), 15538. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52116-6>

Buduneli, N. & Kinane, D. F. (2011). Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(11), 85-105. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01670.x>

Buset, S. L., Walter, C., Friedmann, A., Weiger, R., Borgnakke, W. S., & Zitzmann, N. U. (2016). Are periodontal diseases really silent? A systematic review of their effect on quality of life. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(4), 333-344. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12517>

Casanova, L., Hughes, F. J., & Preshaw, P. M. (2014). Diabetes and periodontal disease: a two-way relationship. *British Dental Journal*, 217(8), 433-437. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.907>

Cavalla, F., Araujo-Pires, A. C., Bigueti, C. C., & Garlet, G. P. (2014). Cytokine Networks Regulating Inflammation and Immune Defense in the Oral Cavity. *Current Oral Health Reports*, 1(2), 104–113. <https://doi.org/10.1007/s40496-014-0016-9>

Cavalla, F., Hernández-Rios, P., Sorsa, T., Bigueti, C., & Hernández, M. (2017). Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 440. <https://doi.org/10.3390/ijms18020440>

Chapple, I. L. C., & Genco, R. (2013). Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Periodontology*, 84(4), 106–112.

<https://doi.org/10.1902/jop.2013.1340011>

Checchi, V., Maravic, T., Bellini, P., Generali, L., Consolo, U., Breschi, L., & Mazzoni, A. (2020). The Role of Matrix Metalloproteinases in Periodontal Disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(14), 4923.

<https://doi.org/10.3390/ijerph17144923>

Chibebe, P. C., Terreri, M., Ricardo, L. H., & Pallos, D. (2008). Uma visão atual do fluido gengival crevicular como método de diagnóstico periodontal. *Revista de Ciências Médicas, Campinas*, 17(3-6), 167-173.

Cui, N., Hu, M., Khalil, R.A. (2017). Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Progress in Molecular Biology Translational Science*, 147, 1-73.

<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>

da Costa, T. A., Silva, M. J. B., Alves, P. M., Chica, J. E. L., Barcelos, E. Z., Giani, M. A. A., Garlet, G. P., da Silva, J. S., Júnior, V. R., Rodrigues, D. B. R., & Cardoso, C. R. B. (2015). Inflammation Biomarkers of Advanced Disease in Nongingival Tissues of Chronic Periodontitis Patients. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1-10.

<https://doi.org/10.1155/2015/983782>

Dalton, S. J., Mitchell, D. C., Whiting, C. V., & Tarlton, J. F. (2005). Abnormal Extracellular Matrix Metabolism in Chronically Ischemic Skin: A Mechanism for Dermal Failure in Leg Ulcers. *Journal General Internal Medicine*, 20(5), 373–379.

<https://doi.org/10.1111/j.0022-202x.2005.23789.x>

Ejeil, A. L., Igondjo-Tchen, S., Ghomrasseni, S., Pellat, B., Godeau, G., & Gogly, B. (2003). Expression of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in Healthy and Diseased Human Gingiva. *Journal of Periodontology*, 74(2), 188-195.

<https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.2.188>

- Ferreira, M. C., Dias-Pereira, A. C., Branco-de-Almeida, L. S., Martins, C. C., & Paiva, S. M. (2017). Impact of periodontal disease on quality of life: a systematic review. *Journal of Periodontal Research*, 52(4), 651-665.
<https://doi.org/10.1111/jre.12436>
- Fields, G. B. (2019). The Rebirth of Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Moving Beyond the Dogma. *Cells*, 8(9), 984.
<https://doi.org/10.3390/cells8090984>
- Fischer, T., & Riedl, R. (2019). Inhibitory Antibodies Designed for Matrix Metalloproteinase Modulation. *Molecules*, 24(12), 2265.
<https://doi.org/10.3390/molecules24122265>
- Fischer, R. G., Junior, R. L., Retamal-Valdes, B., Figueiredo, L. C., Malheiros, Z., Stewart, B., & Feres, M. (2020). Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section V: Treatment of periodontitis. *Brazilian Oral Research*, 34(1).
<https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2020.vol34.0026>
- Gasner, N. S., & Schure, R. S. (2021). Periodontal Disease. *StatPearls Publishing, Treasure Island*.
- Gil-Montoya, J. A., Sánchez-Lara, I., Carnero-Pardo, C., Fornieles-Rubio, F., Montes, J., Barrios, R., Gonzalez-Moles, M. A., & Bravo, M. (2017). Oral Hygiene in the Elderly with Different Degrees of Cognitive Impairment and Dementia. *Journal of the American Geriatrics Society*, 65(3), 642-647.
<https://doi.org/10.1111/jgs.14697>
- Haag, D. G., Peres, K. G., Balasubramanian, M., & Brennan, D. S. (2017). Oral Conditions and Health-Related Quality of Life: A Systematic Review. *Journal of Dental Research*, 96(8), 864-874.
<https://doi.org/10.1177/0022034517709737>

- Helal, O., Göstemeyer, G., Krois, J., El Sayed, K. F., Graetz, C., & Schwendicke, F. (2019). Predictors for tooth loss in periodontitis patients: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 46(7), 699-712.
<https://doi.org/10.1111/jcpe.13118>
- Hernández, M., Gamonal, J., Tervahartiala, T., Mäntylä, P., Rivera, O., Dezerega, A., Dutzan, N., & Sorsa, T. (2010). Associations Between Matrix Metalloproteinase-8 and -14 and Myeloperoxidase in Gingival Crevicular Fluid From Subjects With Progressive Chronic Periodontitis: A Longitudinal Study. *Journal of Periodontology*, 81(11), 1644-1652.
<https://doi.org/10.1902/jop.2010.100196>
- Hernández, M., Gamonal, J., Salo, T., Tervahartiala, T., Hukkanen, M., Tjäderhane, L., & Sorsa, T. (2011). Reduced expression of lipopolysaccharide-induced CXC chemokine in *Porphyromonas gingivalis*-induced experimental periodontitis in matrix metalloproteinase-8 null mice. *Journal of Periodontal Research*, 46(1), 58-66.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2010.01310.x>
- Hernández Ríos, M., Sorsa, T., Obregón, F., Tervahartiala, T., Valenzuela, M. A., Pozo, P., Dutzan, N., Lesaffre, E., Molas, M., & Gamonal, J. (2009). Proteolytic roles of matrix metalloproteinase (MMP)-13 during progression of chronic periodontitis: initial evidence for MMP-13/MMP-9 activation cascade. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(12), 1011-1017.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01488.x>
- Hu, J., Van den Steen, P. E., Sang, Q-X. A., & Opdenakker, G. (2007). Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(6), 480-498.
<https://doi.org/10.1038/nrd2308>
- Hu, X., & Beeton, C. (2010). Detection of Functional Matrix Metalloproteinases by Zymography. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 8(45), 2445.
<https://doi.org/10.3791/2445>

- Hughes, F. J., & Bartold, P. M. (2018). Periodontal complications of prescription and recreational drugs. *Periodontology 2000*, 78(1), 47-58.
<https://doi.org/10.1111/prd.12230>
- Huynh, A. H. S., Veith, P. D., McGregor, N. R., Adams, G. G., Chen, D., Reynolds, E. C., Ngo, L. H., & Darby, I. B. (2015). Gingival crevicular fluid proteomes in health, gingivitis and chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 50(5), 637–649.
<https://doi.org/10.1111/jre.12244>
- Inanc, S., Keles, D., & Oktay, G. (2017) An improved collagen zymography approach for evaluating the collagenases MMP-1, MMP-8, and MMP-13. *Biotechniques*, 63(4), 174-180.
<https://doi.org/10.2144/000114597>
- Kasuma, N., Oenzil, F., Darwin, E., & Sofyan, Y. (2018). The analysis of matrix metalloproteinase-8 in gingival crevicular fluid and periodontal diseases. *Indian Journal of Dental Research*, 29(4), 450-454.
https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_97_15
- Khurshid, Z., Mali, M., Naseem, M., Najeeb, S., & Zafar, M. S. (2017). Human Gingival Crevicular Fluids (GCF) Proteomics: An Overview. *Dentistry Journal*, 5(1), 12.
<https://doi.org/10.3390/dj5010012>
- Kinane, D. F. (2001). Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 25(1), 8–20.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2001.22250102.x>
- Kinane, D. F., Demuth, D. R., Gorr, S. U., Hajishengallis, G. N., & Martin, M. H. (2007). Human variability in innate immunity. *Periodontology 2000*, 45(1), 14-34.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2007.00220.x>
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(17038), 1-14.

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

Korpi, J. T., Aström, P., Lehtonen, N., Tjäderhane, L., Kallio-Pulkkinen, S., Siponen, M., Sorsa, T., Pirilä, E., & Salo, T. (2009). Healing of extraction sockets in collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8)-deficient mice. *European Journal of Oral Sciences*, 117(3), 248-254.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2009.00620.x>

Lang, N. P., & Bartold, P. M. (2018). Periodontal health. *Journal of Periodontology*, 89(1), 9-16.

<https://doi.org/10.1002/jper.16-0517>

Laronha, H., Carpinteiro, I., Portugal, J., Azul, A., Polido, M., Petrova, K. T., Salema-Oom, M., & Caldeira, J. (2020). Challenges in Matrix Metalloproteinases Inhibition. *Biomolecules*, 10(5), 717.

<https://doi.org/10.3390/biom10050717>

Laudenbach, J. M., & Simon, Z. (2014). Common Dental and Periodontal Diseases: Evaluation and Management. *Medical Clinics of North America*, 98(6), 1239–1260.

<https://doi.org/10.1016/j.mcna.2014.08.002>

Leppilähti, J. M., Hernández-Ríos, P. A., Gamonal, J. A., Tervahartiala, T., Brignardello-Petersen, R., Mantyla, P., Sorsa, T., & Hernández, M. (2014). Matrix metalloproteinases and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid provide site-specific diagnostic value for chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(4), 348-356.

<https://doi.org/10.1111/jcpe.12223>

Liang, S., Krauss, J. L., Domon, H., McIntosh, M. L., Hosur, K. B., Qu, H., Li, F., Tzekou, A., Lambris, J. D., & Hajishengallis, G. (2011). The C5a Receptor Impairs IL-12 Dependent Clearance of *Porphyromonas gingivalis* and Is Required for Induction of Periodontal Bone Loss. *The Journal of Immunology*, 186(2), 869–877.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003252>

Lin, M., Jackson, P., Tester, A. M., Diaconu, E., Overall, C. M., Blalock, J. E., & Pearlman, E. (2008). Matrix Metalloproteinase-8 Facilitates Neutrophil Migration through the Corneal Stromal Matrix by Collagen Degradation and Production of the Chemotactic Peptide Pro-Gly-Pro. *The American Journal of Pathology*, 173(1), 144-153.

<https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080081>

López, R., Smith, P. C., Göstemeyer, G., & Schwendicke, F. (2017). Ageing, dental caries and periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(18), 145-152.

<https://doi.org/10.1111/jcpe.12683>

Machado, V., Botelho, J., Neves, J. A., Proença, L., Delgado, A. S., & Mendes, J. J. (2020). The prevalence of periodontal diseases in Portugal and correspondent digital awareness for the period 2004-2017: analysis of data from Global Burden of Disease and Google Trends. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 61(1), 10-16.

<https://doi.org/10.24873/j.rpemd.2020.03.693>

Malemud, C. J. (2006). Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 11(2), 1696-1701.

<https://doi.org/10.2741/1915>

Mazzoni, A., Breschi, L., Carrilho, M., Nascimento, F. D., Orsini, G., Ruggeri Jr, A., Gobbi, P., Manzoli, L., Tay, F. R., Pashley, D. H., & Tjäderhane, L. (2012). A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part II: enzymes, serum proteins, and growth factors. *Endodontic Topics*, 21(1), 19-40.

<https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00268.x>

- Mc Crudden, M. T. C., Irwin, C. R., El karim, I., Linden, G. J., & Lundy, F. T. (2017). Matrix metalloproteinase-8 activity in gingival crevicular fluid: development of a novel assay. *Journal of Periodontal Research*, 52(3), 556–561. <https://doi.org/10.1111/jre.12423>
- Meyer, F. J., Burnand, K. G., Abisi, S., TeKoppele, J. M., van Els, B., & Smith, A. (2008). Effect of collagen turnover and matrix metalloproteinase activity on healing of venous leg ulcers. *British Journal of Surgery*, 95(3), 319–325. <https://doi.org/10.1002/bjs.5946>
- Morelli, E. L., Broadbent, J. M., Leichter, J. W., & Thomson, W. M. (2018). Pregnancy, parity and periodontal disease. *Australian Dental Journal*, 63(3), 270–278. <https://doi.org/10.1111/adj.12623>
- Murakami, S., Mealey, B. L., Mariotti, A., & Chapple, I. L. C. (2018). Dental plaque-induced gingival conditions. *Journal of Periodontology*, 89(1), 17–27. <https://doi.org/10.1002/jper.17-0095>
- Murphy, G., & Nagase, H. (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(5), 290–308. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.002>
- Nazir, M. A. (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Sciences*, 1(2), 72–80.
- Negrato, C. A., & Tarzia, O. (2010). Buccal alterations in diabetes mellitus. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-2-3>
- Neves, M. C., Neves J. S., Gouveia, M., Estevinho, F., Subtil, P., & Leite-Moreira, J. (2019). Diabetes Mellitus e Doença periodontal. *Revista Portuguesa de Diabetes*, 14(2), 63–70.
- Ordem dos Médicos Dentistas & Sociedade Portuguesa de Periodontologia e Implantes.

(2021). *As doenças periodontais podem ser prevenidas.*

Orozco-Páez, J., Rodríguez-Cavallo, E., Díaz-Caballero, A., & Méndez-Cuadro, D. (2021). Quantification of matrix metalloproteinases MMP-8 and MMP-9 in gingival overgrowth. *The Saudi Dental Journal*, 33(5), 260-267.
<https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2020.07.001>

Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N.W. (2005). Periodontal diseases. *The Lancet Journal*, 366(9499), 1809-1820.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67728-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67728-8)

Preshaw, P. M., & Bissett, S. M. (2013). Periodontitis: Oral Complication of Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 42(4), 849–867.
<https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.05.012>

Rai, B., Kaur, J., Jain, R., & Anand, S. C. (2010). Levels of gingival crevicular metalloproteinases-8 and -9 in periodontitis. *The Saudi Dental Journal*, 22(3), 129–131.
<https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2010.04.006>

Rai, B., Kaur, J., Anand, S. C., & Jacobs, R. (2011). Salivary Stress Markers, Stress, and Periodontitis: A Pilot Study. *Journal of Periodontology*, 82(2), 287–292.
<https://doi.org/10.1902/jop.2010.100319>

Reners, M., & Brex, M. (2007). Stress and periodontal disease. *International Journal of Dental Hygiene*, 5(4), 199–204.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2007.00267.x>

Saito, A., Horie, M., Ejiri, K., Aoki, A., Katagiri, S., Maekawa, S., Suzuki, S., Kong, S., Yamauchi, T., Yamaguchi, Y., Izumi, Y., & Ohshima, M. (2017). MicroRNA profiling in gingival crevicular fluid of periodontitis-a pilot study. *FEBS Open Bio*, 7(7), 981-994.
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.1223>

- Scott, D. A., & Krauss, J. (2012). Neutrophils in Periodontal Inflammation. *Frontiers of Oral Biology*, 15, 56–83.
<https://doi.org/10.1159/000329672>
- Segerstrom, S. C., & Miller, G. E. (2004). Psychological Stress and the Human Immune System: A Meta-Analytic Study of 30 Years of Inquiry. *Psychological Bulletin*, 130(4), 601–630.
<https://doi.org/10.1037/0033-2909.130.4.601>
- Sehdev, B., Ganji, K. K., Bhongade, M. L., Toriya, J., Imanishi, T., Shoumura, M., & Alam, M. K. (2017). Evaluation of the impact of the clinical periodontal status on volumetric features of gingival crevicular fluid by using periotron® 8000. *Journal of Hard Tissue Biology*, 26(2), 187–194.
<https://doi.org/10.2485/jhtb.26.187>
- Silva, F., Araujo, D., Lima, J., Rezende, A., Abreu, B., & Dias, F. (2014). Enzymatic activity analysis of MMP-2 and 9 collected by swab from lower limb venous ulcers. *Jornal Vascular Brasileiro - Cirurgia Vascular, Endovascular e Angiologia*, 13(3).
<https://doi.org/10.1590/jvb.2014.038>
- Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., Hernández, M., & Gamonal, J. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of Applied Oral Science*, 23(3), 329-355.
<https://doi.org/10.1590/1678-775720140259>
- Snoek-van Beurden, P. A. M. & Von den Hoff, J. W. (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*, 38(1), 73-83.
<https://doi.org/10.2144/05381RV01>
- Sociedade Portuguesa de Periodontologia e Implantes. (2021). *Doenças periodontais: Saiba como preveni-las e mantê-las sob controlo.*

- Sorsa, T., Tjäderhane, L., Konttinen, Y. T., Lauhio, A., Salo, T., Lee, H. M., Golub, L. M., Brown, D. L., & Mäntylä, P. (2006). Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Annals of Medicine*, 38(5), 306–321.
<https://doi.org/10.1080/07853890600800103>
- Soto, A. P., & Meyer, S. L. (2021). Oral Implications of Polypharmacy in Older Adults. *Dental Clinics of North America*, 65(2), 323-343.
<https://doi.org/10.1016/j.cden.2020.11.007>
- Stadler, A. F., Angst, P. D. M., Arce, R. M., Gomes, S. C., Oppermann, R. V, & Susin, C. (2016). Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: a meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(9), 727-45.
<https://doi.org/10.1111/jcpe.12557>
- Stathopoulou, P. G., Buduneli, N., & Kinane, D. F. (2015). Systemic Biomarkers for Periodontitis. *Current Oral Health Reports*, 2(4), 218–226.
<https://doi.org/10.1007/s40496-015-0072-9>
- Sternlicht, M. D., & Werb, Z. (2001). How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17(1), 463–516.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.463>
- 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(6), 135-139.
https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_56_19
- Susin, C., Haas, A. N., & Albandar, J. M. (2014). Epidemiology and demographics of aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 65(1) 27-45.
<https://doi.org/10.1111/prd.12019>
- Tajhya, R. B., Patel, R. S., & Beeton, C. (2017). Detection of Matrix Metalloproteinases by Zymography. *Methods in Molecular Biology*, 1579, 231-244.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6863-3_12

Tester, A. M., Cox, J. H., Connor, A. R., Starr, A. E., Dean, R. A., Puente, X. S., López-Otín, C., Overall, C. M. (2007). LPS Responsiveness and Neutrophil Chemotaxis in Vivo Require PMN MMP-8 Activity. *PLoS One*, 2(3), 312.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000312>

Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), 149-161.
<https://doi.org/10.1111/jcpe.12945>

Tsuchida, S., Satoh, M., Sogawa, K., Kawashima, Y., Kado, S., Ishige, T., Beppu, M., Sawai, S., Nishimura, M., Kodera, Y., Matsushita, K., & Nomura, F. (2014). Application of proteomic technologies to discover and identify biomarkers for periodontal diseases in gingival crevicular fluid: A review. *Proteomics - Clinical Applications*, 8(3-4), 232–240.
<https://doi.org/10.1002/prca.201300122>

Vandenbroucke, R. E., & Libert, C. (2014). Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(12), 904–927.
<https://doi.org/10.1038/nrd4390>

Van Den Steen, P. E., Wuyts, A., Husson, S. J., Proost, P., Van Damme, J., & Opdenakker, G. (2003). Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *European Journal of Biochemistry*, 270(18), 3739-3749.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03760.x>

Van Lint, P., Wielockx, B., Puimège, L., Noël, A., López-Otín, C., & Libert, C. (2005). Resistance of Collagenase-2 (Matrix Metalloproteinase-8)-Deficient Mice to TNF-Induced Lethal Hepatitis. *The Journal of Immunology*, 175(11), 7642-7649.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7642>

- Visse, R. & Nagase, H. (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circulation Research*, 92(8), 827–839.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>
- Wassall, R. R., & Preshaw, P. M. (2016). Clinical and technical considerations in the analysis of gingival crevicular fluid. *Periodontology 2000*, 70(1), 65-79.
<https://doi.org/10.1111/prd.12109>
- Wu, M., Chen, S-W., & Jiang, S-Y. (2015). Relationship between Gingival Inflammation and Pregnancy. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2015/623427>
- Zee, K-Y. (2009). Smoking and periodontal disease. *Australian Dental Journal*, 54(1), 44–50.
<https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01142.x>

ANEXOS

Anexo 1 - Termo de Consentimento Informado.



Consentimento Informado

Código | IMP:EM.PE.17_03

Monte de Caparica, __de _____ de _____

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito do curso de Mestrado Integrado em Medicina Dentária do Instituto Universitário Egas Moniz sob a orientação do Prof. Doutor Ricardo Alves, solicita-se autorização para a participação no estudo “Relação entre polimorfismos no promotor dos genes das metalopeptidases 8 e 9, atividade proteolítica e a suscetibilidade à periodontite numa população Portuguesa” a pacientes da Clínica Universitária Egas Moniz.

O estudo tem como objetivo avaliar os fatores de risco genéticos para a periodontite (inflamação e perda de osso à volta do dente) a partir de amostras recolhidas da mucosa oral e fluído crevicular (líquido produzido pela gengiva) assim como potenciais marcadores para o diagnóstico precoce da doença.

A sua participação consiste em: i) exame oral, habitual em consultas; ii) realização de um pequeno questionário e iii) recolha de uma amostra da mucosa oral por meio duma zaragatoa e duas recolhas de fluído crevicular, antes e após tratamento cirúrgico. A recolha do fluido crevicular demora apenas alguns minutos, será efetuada de forma não invasiva, com desconforto mínimo, usando tiras de papel esterilizadas.

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

Os resultados deste estudo poderão contribuir para definir critérios de diagnóstico precoce da periodontite, determinação da severidade da doença e a capacidade de detetar precocemente recidivas.

A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e/ou publicação, e será apenas tratada pelos responsáveis e/ou outros colaboradores do projeto. A sua recolha é anónima e confidencial.

Anexo 1 - Continuação.

(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 2 - Periodontograma.

[illegible]

Anexo 3 - Questionário de recolha e registo de dados.



Relação entre polimorfismos no promotor dos genes das metalopeptidases 8 e 9, atividade proteolítica e a suscetibilidade à periodontite numa população Portuguesa

Questionário para seleção dos participantes

Proc nº: _____

Código de amostra: _____

Sexo: F ___ / M ___

Idade: _____

Nº de dentes: _____

Periodontite: SIM ☐ NÃO ☐

Gravidez ou amamentação: SIM ☐ NÃO ☐ NÃO Aplicável ☐

Aparelho ortodôntico: SIM ☐ NÃO ☐

Último tratamento periodontal há menos 6 meses: SIM ☐ NÃO ☐

Perda ponderal (cancro e/ou doença inflamatória crónica): SIM ☐ NÃO ☐

se sim, Qual? _____

Outras doenças/patologia: _____ (exemplo diabetes, hipertensão)

A Preencher pelo Coordenador do Projeto de investigação:

Cumpe critérios de Inclusão SIM ☐ NÃO ☐

Anexo 4 - Curva de calibração do marcador de massa molecular (exemplo).