



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO PROMOTOR DO GENE
DA METALOPROTEINASE 8 COM A PERIODONTITE – ESTUDO
PILOTO**

Trabalho submetido por
Inês Martins de Almeida
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

fevereiro de 2023



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO PROMOTOR DO GENE DA METALOPROTEINASE 8 COM A PERIODONTITE – ESTUDO PILOTO

Trabalho submetido por
Inês Martins de Almeida
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Isabel Barahona

e coorientado por
Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro e Prof. Doutor Ricardo Alves

fevereiro de 2023

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Doutora Isabel Barahona, por ter aceitado orientar a minha tese e pela total disponibilidade, apoio e dedicação demonstrados durante a redação da mesma.

À Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro, por ter aceitado ser minha coorientadora, pela partilha de conhecimentos, por ter estado sempre presente e disponível para me ajudar, ao longo da realização deste projeto.

Ao Prof. Doutor Ricardo Alves, por aceitado ser meu coorientador, pela disponibilidade, apoio e ajuda demonstrada.

Aos meus pais e à minha irmã, pela força que sempre me deram e por me fazerem acreditar que seria capaz de concretizar mais esta etapa da minha vida, desde o primeiro até ao último dia.

À minha família, por todo o apoio incondicional e por também terem estado sempre presentes, nos momentos mais importantes.

À minha querida amiga Mariana, que me acompanha desde o secundário, com a qual partilhei as melhores e as menos boas memórias, em quem sempre depus total confiança e terá para sempre a minha amizade.

À minha colega de box e grande amiga, Rita, que sempre me apoiou e esteve presente nos bons e maus momentos, a todas as horas durante estes longos 5 anos.

À minha amiga Catarina, por me ter incentivado e ajudado em todos os momentos, por ter partilhado este longo percurso comigo e por me oferecer a sua amizade.

À minha amiga Filipa, uma conselheira incondicional, com a qual tive o prazer de partilhar muitas memórias felizes, que levarei comigo para sempre.

Ao João, a melhor pessoa que podia ter ao meu lado, pelo apoio e motivação incansáveis, por me encorajar sempre a ser a melhor versão de mim mesma e nunca me deixar desistir.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, pelos ensinamentos e valores transmitidos ao longo destes 5 anos, que guardarei sempre no meu coração.

RESUMO

Objetivos: Caracterizar a relação entre a existência do polimorfismo do promotor do gene da metaloproteinase 8 e o desenvolvimento de periodontite, através de um estudo piloto realizado numa população portuguesa de utentes da Clínica Dentária Egas Moniz.

Materiais e Métodos: Selecionou-se uma amostra de 45 indivíduos, sendo que 21 eram pacientes periodontais e os restantes 24 tinham saúde periodontal. Procedeu-se à recolha de amostras com células da mucosa jugal, com recurso a um OmniSwab, para posterior extração do DNA respetivo. Efetuou-se a análise genética para o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹. Esta análise foi realizada através das técnicas de PCR (*Polymerase chain reaction*) e RFLP (*Restriction fragment lenght polymorphism*), seguidas da análise eletroforética. Adicionalmente, ainda se procedeu à análise estatística, por meio do *Software R Statistical 4.0 (R package based on χ^2 test, Statistical Computing and Graphics, Inc.)*.

Resultados: Verificou-se que para o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ a presença do alelo mutado (T) foi significativamente superior no grupo doença (60%), comparativamente ao grupo controlo (31%). Neste sentido, existem evidências estatisticamente significativas para afirmar que há uma correlação entre as frequências alélicas e a ocorrência de periodontite ($p = 0,013$). Assim, o presente estudo piloto sustenta a hipótese de que os alelos T estão associados à ocorrência de periodontite.

Conclusão: Verificou-se que o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ está significativamente associado à periodontite.

Palavras-chave: periodontite; MMP-8; polimorfismo; genética.

ABSTRACT

Objective: To characterize the relationship between the existence of the polymorphism in the promoter of metalloproteinase 8 gene and the development of periodontitis, through a pilot study carried out in a Portuguese population of patients that attended the Egas Moniz Dental Clinic.

Materials and Methods: A sample with 45 individuals was used, 21 of which were periodontal patients and the remaining 24 had periodontal health. Samples with cells from the jugal mucosa were collected, with the help of an OmniSwab, for later extraction of the respective DNA. Genetic analysis for the MMP-8⁻⁷⁹⁹ polymorphism was performed through PCR (*Polymerase chain reaction*) and RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) techniques, followed by electrophoretic analysis. Additionally, statistical analysis was carried out using the R Statistical 4.0 Software (R package based on χ^2 test, Statistical Computing and Graphics, Inc.).

Results: It was found that for the MMP-8⁻⁷⁹⁹ polymorphism the presence of the mutated allele (T) was significantly higher in the disease group (60%) compared to the control group (31%). In this sense, there is statistically significant evidence to affirm that there is a correlation between allele frequencies and the occurrence of periodontitis ($p = 0.013$). Thus, the present pilot study supports the hypothesis that T alleles are associated with the occurrence of periodontitis.

Conclusion: The MMP-8⁻⁷⁹⁹ polymorphism was found to be significantly associated with periodontitis.

Keywords: periodontitis; MMP-8; polymorphism; genetics.

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	13
1. Periodontite.....	13
1.1 Definição de Periodontite	13
1.2 Etiologia da Periodontite	14
1.3 Características clínicas e histopatológicas.....	15
1.4 Evolução da Classificação das Doenças Periodontais e a nova Classificação das Doenças Periodontais e Peri-Implantais	17
1.5 Fatores de risco	20
1.6 Prevalência da doença periodontal	22
2. Marcadores inflamatórios na periodontite	23
2.1 Caracterização das metaloproteinases de matriz (MMPs).....	23
2.2 MMP-8	26
2.3 MMP-8 como um biomarcador na periodontite	28
3. Polimorfismos genéticos	31
3.1 Definição de polimorfismo	31
3.2 <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP)	34
4. Associação dos polimorfismos genéticos e a periodontite	36
4.1 O papel da genética na periodontite	36
4.2 Polimorfismos genéticos na periodontite	37
5. Técnicas laboratoriais para a análise dos polimorfismos	39
5.1 Técnica de <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	39
5.2 Técnica de <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP).....	41
II. OBJETIVOS E HIPÓTESES DO ESTUDO	43
III. MATERIAIS E MÉTODOS	45
1. Considerações éticas.....	45
2. Caracterização do estudo	45
3. Local de realização do estudo.....	46
4. Seleção da amostra	46
5. Critérios de inclusão	47

6.	Critérios de exclusão	47
7.	Protocolo Clínico.....	47
7.1	Colheita de material genético	48
7.2	Extração de DNA	49
7.3	Técnica de <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	53
7.4	Análise Eletroforética dos produtos amplificados do gene MMP8.....	56
7.5	Análise do polimorfismo MMP-8 ⁻⁷⁹⁹ por <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP).....	58
8.	Análise Estatística	61
IV.	RESULTADOS	63
1.	Análise das técnicas de PCR e PCR-RLP	63
2.	Características demográficas	67
3.	Frequências genotípicas.....	70
4.	Frequências alélicas.....	72
V.	DISCUSSÃO	75
VI.	CONCLUSÕES.....	83
VIII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
IX.	ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funções das MMPs. Adaptado de (Khuda et al., 2021).....	23
Figura 2. Colheita de material genético da mucosa jugal com recurso a um OmniSwab (Whatman FTA).	48
Figura 3. Representação esquemática de um OmniSwab (Whatman FTA).....	48
Figura 4. Proteinase K.	49
Figura 5. <i>Buffer</i> ATL.....	49
Figura 6. Vórtex.	49
Figura 7. Bloco incubador.	50
Figura 8. Centrifugadora.	50
Figura 9. <i>Buffer</i> AL.	50
Figuras 10 e 11. Coluna QIAamp MinElute inserida num tubo coletor de 2 ml.....	51
Figura 12. <i>Buffer</i> AW1.....	51
Figura 13. <i>Buffer</i> AW2.....	51
Figura 14. Etanol Absoluto (96-100%).	52
Figura 15. <i>Buffer</i> ATE.....	53
Figura 16. <i>Primers forward e reverse.</i>	54
Figura 17. MyTaq.....	54
Figura 18. Suporte com minitubos “eppendorf” para análise PCR.	55
Figuras 19 e 20. Termociclador <i>MJ MINI™ Personal Thermal Cycler</i>	56
Figura 21. SeaKem® LE Agarose.....	56
Figura 22. TAE 1X.....	56
Figura 23. Corante <i>RedSafe</i>	56
Figura 24. Cama de gel com pentes dentados.	57
Figura 25. Tampão com glicerol e azul de bromofenol a 0,05%.	57
Figura 26. NZYDNA <i>Ladder</i> VI.....	57
Figura 27. Tina horizontal de eletroforese.	58
Figura 28. Gel de agarose a 2% exemplificativo do resultado do PCR de algumas amostras. M: marcador de massas moleculares (NZYDNA <i>Ladder</i> VI); CN: controlo negativo.	58
Figura 29. Enzima de restrição Sfc I.	59
Figura 30. NEBuffer 4.....	59
Figura 31. Suporte com tubos “eppendorf” para análise RFLP.	60
Figura 32. Estufa.	60
Figura 33. Bandas do marcador de massas moleculares NZYDNA <i>Ladder</i> VI.....	63
Figura 34. Gel de agarose a 3% exemplificativo de algumas amostras. M: marcador de massas moleculares (NZYDNA <i>Ladder</i> VI); Grupo controlo: nº 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24; Grupo doença: amostras nº 31, 39, 40, 42. As amostras 13, 17, 18, 20, 21, 31 e 42 eram homozigóticas para o alelo C, visto observarem-se as bandas correspondentes ao alelo C (172 + 113 pb). Em contrapartida, os indivíduos 14, 15, 16, 19, 22, 23, 24, 39 e 40 eram heterozigóticos, uma vez que foi possível observarem-se as 3 bandas distintas correspondentes ao alelo C e T (285, 172 e 113 pb).....	64

Figura 35. Gel de agarose a 3% exemplificativo de algumas amostras do grupo doença. M: marcador de massas moleculares (NZYDNA <i>Ladder</i> VI); Grupo doença: pacientes nº 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45. Os pacientes 36, 41 e 45, nos quais foi possível observar o fragmento 285 pb, eram homozigóticos para o alelo T, apresentando, assim, o genótipo TT. Para os indivíduos heterozigóticos, ou seja, os pacientes correspondentes aos números 37, 38, 39, 40, 43 e 44, observaram-se as 3 bandas correspondentes aos alelos C e T. Desta forma, nestes indivíduos foi possível verificar a presença dos fragmentos 285, 172 + 113 pb. No entanto, no paciente 42 apenas foi possível visualizarem-se os fragmentos 172 + 113 pb, correspondentes ao alelo C, pelo que este paciente foi considerado homozigótico para o alelo C, sendo portador do genótipo CC.	65
Figura 36. Gel de agarose a 3% exemplificativo de algumas amostras do grupo doença. M: marcador de massas moleculares (NZYDNA <i>Ladder</i> VI); Grupo doença: pacientes nº 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35. Os pacientes 25, 28, 30 e 35 eram homozigóticos para o alelo T (285 pb), enquanto os pacientes 31 e 34 eram homozigóticos para o alelo C (172 + 113 pb). Todavia, nos pacientes 26, 27, 29, 32 e 33 verificou-se a presença de ambos os alelos, pelo que eram heterozigóticos (285, 172 + 113 pb).	65
Figura 37. Gel de agarose a 3% exemplificativo de algumas amostras do grupo controlo. M: marcador de massas moleculares (NZYDNA <i>Ladder</i> VI); Grupo controlo: nº 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Relativamente ao grupo controlo, apenas se observou uma banda correspondente ao alelo T (285 pb) nos indivíduos 4 e 8, sendo estes homozigóticos para o alelo T. Nos indivíduos 1, 2, 6, 7, 9 e 12 verificou-se a presença das bandas correspondentes ao alelo C (172 + 113 pb), pelo que eram homozigóticos para o alelo C. Já no caso dos indivíduos 3, 5, 10 e 11 observou-se a presença das 3 bandas correspondentes a ambos os alelos (285, 172 + 113 pb), pelo que apresentavam um genótipo heterozigótico.	66
Figuras 38 e 39. Prevalência dos genótipos e alelos para o polimorfismo MMP-8 ⁻⁷⁹⁹ . 67	
Figura 40. Prevalência das frequências genotípicas em função do género, para o polimorfismo MMP-8 ⁻⁷⁹⁹	68
Figura 41. Prevalência das frequências alélicas em função do género, para o polimorfismo MMP-8 ⁻⁷⁹⁹	70
Figura 42. Prevalência dos genótipos CC, TT e CT no polimorfismo MMP-8 ⁻⁷⁹⁹ , em ambos os grupos.	71
Figura 43. Prevalência dos alelos C e T no polimorfismo MMP-8 ⁻⁷⁹⁹ , em ambos os grupos.	73
Figura 44. Distribuição alélica para o polimorfismo MMP-8 ⁻⁷⁹⁹ , em diferentes populações. Adaptado de: https://www.ensembl.org/index.html	80
Figura 45. Distribuição genotípica para o polimorfismo MMP-8 ⁻⁷⁹⁹ , em diferentes populações. Adaptado de: https://www.ensembl.org/index.html	80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da Periodontite, mediante o estágio. Adaptado de (Tonetti et al., 2018).....	19
Tabela 2. Classificação da Periodontite, mediante o grau. Adaptado de (Tonetti et al., 2018).....	20
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> selecionados para o polimorfismo genético MMP-8 ⁻⁷⁹⁹ . Adaptado de (Shen et al., 2017).	53
Tabela 4. Preparação das amostras para a técnica PCR.....	54
Tabela 5. Preparação das amostras para discriminação alélica, através da técnica de RFLP.....	59
Tabela 6. Endonuclease de restrição, temperatura e fragmentos esperados. Adaptado de (Shen et al., 2017).....	60
Tabela 7. Perfil de restrição da endonuclease. Adaptado de (Shen et al., 2017).....	60
Tabela 8. Frequência de genótipos e alelos para o polimorfismo MMP-8 ⁻⁷⁹⁹ . N: tamanho da amostra.....	66
Tabela 9. Frequências genotípicas por gênero, para o polimorfismo MMP-8 ⁻⁷⁹⁹ . N: tamanho da amostra.	67
Tabela 10. Frequências alélicas por gênero, para o polimorfismo MMP-8 ⁻⁷⁹⁹	69
Tabela 11. Frequências genotípicas nos grupos controlo e doença para o polimorfismo MMP-8 ⁻⁷⁹⁹ . N: tamanho da amostra.	71
Tabela 12. Frequências alélicas nos grupos controlo e doença para o polimorfismo MMP-8 ⁻⁷⁹⁹ . n: totalidade de alelos na amostra.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: Adenina

AL: Tampão de lise

aMMP-8: Metaloproteinase de matriz 8 ativa

ATE: Tampão de eluição

ATL: Tampão de lise

AW: Tampão de lavagem

C: Citosina

CAL: Perda de inserção clínica

CI: Intervalo de confiança

CN: Controlo negativo

CNV: *Copy Number Variations*

COX-2: Cicloxigenase 2

DM: *Diabetes Mellitus*

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

dNTP: *Deoxynucleoside triphosphate*

FCG: Fluido crevicular gengival

G: Guanina

H-W: Hardy-Weinberg

IL-6: Interleucina-6

IUEM: Instituto Universitário Egas Moniz

M: Marcador de massas moleculares

mA: Miliampere

MEC: Matriz extracelular

MgCl₂: Cloreto de magnésio

ml: Mililitro

mm: Milímetro

MMP: Metaloproteinase de matriz

MMP-8: Metaloproteinase de matriz 8

mRNA: RNA mensageiro

MT-MMPs: Metaloproteinase de matriz do tipo membranar

NIP: Nível de inserção periodontal

pb: pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

Pg: *Porphyromonas gingivalis*

PMNLs: Leucócitos polimorfonucleares humanos

PS: Profundidade de sondagem

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

rpm: Rotações por minuto

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

STR: *Short Tandem Repeat*

T: Timina

TAE: Tris acetato EDTA

Td: *Treponema denticola*

Tf: *Tannerella forsythia*

TIMPs: Inibidores tecidulares de metaloproteinases de matriz

tMMP-8: Metaloproteinase de matriz 8 total

TSS: *Transcription Start Site*

UTR: *Untranslated Transcribed Region*

VNTR: *Variable Number of Tandem Repeats*

μl: Microlitro

μM: Micromolar

°C: Graus Celsius

χ²: Teste de independência do Qui-quadrado

I. INTRODUÇÃO

1. Periodontite

1.1 Definição de Periodontite

A doença periodontal consiste num processo inflamatório crónico multifatorial, que se caracteriza pela destruição progressiva do periodonto, podendo manifestar-se de uma forma reversível (gingivite) e irreversível (periodontite) (Almeida et al., 2006; Bascones-Martinez et al., 2011; Caton et al., 2018; Papanou et al., 2018).

A gingivite é uma condição inflamatória, consequente da acumulação de biofilme microbiano, que está confinada ao tecido gengival e manifesta-se clinicamente através da alteração da cor da gengiva, que se encontra edemaciada e com presença de hemorragia (Almeida et al., 2006; Bascones-Martinez et al., 2011; Chapple et al., 2018; Pihlstrom et al., 2005). Durante esta fase, verifica-se um desequilíbrio entre as defesas do hospedeiro e as bactérias periodontopatogénicas da microbiota oral, que culmina em alterações vasculares, na formação de um exsudado inflamatório e na fragilização da estrutura constituinte do compartimento superior do periodonto (Almeida et al., 2006; Bascones-Martinez et al., 2011; Chapple et al., 2018; de Moraes et al., 2018). A gingivite propicia a fragilização deste compartimento superior e facilita um maior acesso aos tecidos subjacentes, por parte dos agentes bacterianos e/ou dos seus subprodutos, podendo este processo culminar na formação de bolsas periodontais, com reabsorção óssea e migração apical do epitélio de união, caso a causa não seja eliminada. Esta situação perpetua o processo inflamatório que pode vir a dar origem à periodontite (Almeida et al., 2006; Caton et al., 2018; Coventry et al., 2000). De notar que a periodontite é sempre precedida pela gingivite, no entanto, a gingivite nem sempre evolui para periodontite (Rai et al., 2008; Trombelli et al., 2018).

A teoria por detrás da progressão da doença periodontal tem sido uma temática de debate. Atualmente, concorda-se que a doença periodontal progride por meio de surtos intermitentes de atividade (Caton et al., 2018; Socransky et al., 1998). De acordo com esta teoria, o suporte do tecido periodontal, ou seja, o periodonto, constituído pela gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar, é perdido durante

episódios curtos e agudos, seguidos de períodos prolongados de quiescência (Hernández et al., 2012; Reddy et al., 1997).

Embora a presença de bactérias anaeróbias gram-negativas seja fundamental para iniciar a destruição periodontal, a suscetibilidade individual e os fatores ambientais têm um papel fulcral na manifestação desta doença, que se caracteriza pela perda progressiva e irreversível do tecido conjuntivo e do osso alveolar (Chapple et al., 2018; Papanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018; Trombelli et al., 2018; Tsai et al., 2017).

É, ainda, importante referir que a periodontite, a par da cárie dentária, constitui um dos principais motivos da perda de peças dentárias em adultos, e tem sido associada a diversas doenças sistémicas, nomeadamente doenças cardiovasculares, *Diabetes Mellitus* (DM), infeções pulmonares, artrite reumatóide, entre outras (Franco et al., 2017; Jepsen et al., 2018; Papanou et al., 2018).

1.2 Etiologia da Periodontite

Tal como supramencionado, a periodontite é uma doença inflamatória de etiologia multifatorial (Li et al., 2016; Sorsa et al., 2018). Diversos estudos aludem para o facto de pacientes com um deficiente controlo de placa bacteriana apresentarem um maior risco para o desenvolvimento desta doença. O papel da colonização bacteriana no desenvolvimento da periodontite é vastamente documentado na literatura como um fator necessário, mas não suficiente para a evolução desta patologia (Chou et al., 2011; Khuda et al., 2021; Umeizudike et al., 2022).

As bactérias periodontopatogénicas são fundamentais e responsáveis pelo estabelecimento deste processo patológico. Estas estão organizadas num biofilme oral, que constitui a placa bacteriana, uma substância esbranquiçada, que se deposita inicialmente na superfície dentária (placa supragengival) e, posteriormente, a nível do sulco gengival (placa subgengival) (Chou et al., 2011; Khuda et al., 2021). Caso não seja removida durante a escovagem dos dentes, esta placa pode evoluir para tártaro dentário, por mineralização. Desta forma, é possível afirmar que se verifica uma correlação direta entre a acumulação de placa dentária e o desenvolvimento da gengivite. Contudo, os mecanismos envolvidos na transição da gengivite para periodontite são mais complexos (Page & Kornman, 1997; Pihlstrom et al., 2005).

O perfil bacteriano associado à periodontite é bastante complexo e diverso. Segundo Socransky et al. (1998), o complexo mais fortemente associado a esta doença é o complexo vermelho, que inclui a *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td) e *Tannerella forsythia* (Tf). De acordo com a evidência, estas são as bactérias mais comumente associadas ao aumento da profundidade das bolsas periodontais (Coventry et al., 2000; Martinez & Ruiz, 2005; Socransky et al., 1998; Solomon et al., 2017).

Apesar de se considerar que a exposição prolongada às bactérias e aos seus produtos presentes no biofilme oral seja um pré-requisito para a destruição do periodonto, apenas a sua presença não é suficiente para desencadear o processo patológico que leva à destruição do periodonto. É também necessário que o hospedeiro seja suscetível à infecção (Khuda et al., 2021; Murthykumar et al., 2019; Page & Kornman, 1997). A resposta inflamatória exacerbada é modulada por inúmeros fatores locais e gerais, que podem ser inatos ou adquiridos. A subsequente destruição tecidual decorrente da progressão da periodontite resulta de um desequilíbrio entre os mecanismos protetores e destrutivos do hospedeiro, que são desencadeados com a infecção. É precisamente a combinação entre fatores do hospedeiro/predisposição do indivíduo e fatores ambientais, que determina a patogênese e a taxa de progressão desta doença (Chou et al., 2011; Holla et al., 2012; Li et al., 2016; Sahingur & Cohen, 2004).

1.3 Características clínicas e histopatológicas

As características primárias da periodontite remetem para a perda de suporte do tecido periodontal, que se manifesta não só através da perda de inserção clínica (CAL), mas também da perda óssea alveolar confirmada e avaliada radiograficamente. Esta perda de suporte do tecido periodontal é resultante da inflamação gengival mediada pelo hospedeiro (Flemmig, 1999; Papanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

Para um paciente ser identificado como um caso de periodontite, são necessários alguns requisitos, nomeadamente que a perda de inserção interproximal seja detetável em 2 ou mais localizações não adjacentes, ou, então que a CAL a nível vestibular ou lingual/palatina seja igual ou superior a 3 mm com bolsas periodontais, com uma profundidade de sondagem (PS) superior ou igual a 3 mm em 2 dentes, desde que esta perda de inserção não esteja associada a: 1) recessões gengivais de origem traumática; 2) cáries dentárias que se estendam até à região cervical do dente; 3) a presença de perda de

CAL na face distal de um segundo molar, associada a mau posicionamento ou a uma extração de um terceiro molar; 4) uma lesão endo-perio com drenagem através do periodonto marginal; ou, ainda, 5) ocorrência de fratura radicular gengival (Papanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

O novo esquema de Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares baseia-se num sistema multidimensional de estádios e graus da periodontite, que pode ser adaptado à medida que surgem novas evidências. É através deste sistema que se conclui o diagnóstico periodontal definitivo, tanto a nível clínico, como radiográfico (Caton et al., 2018; Papanou et al., 2018).

A periodontite é caracterizada por uma série de alterações histopatológicas, que podem ser classificadas de acordo com o quadro histopatológico das Gengivites (Page & Schroeder, 1976). Segundo esta classificação, a progressão da inflamação gengival e periodontal pode ser avaliada em 4 estádios: lesão inicial (estádio 1), lesão precoce (estádio 2), lesão estabelecida (estádio 3) e lesão avançada (estádio 4). Enquanto os primeiros três estádios constituem a transição de uma gengiva saudável para uma gengivite crónica, o último estágio consiste na transição de gengivite para periodontite (Page & Schroeder, 1976; Smith et al., 2010).

Durante estes estádios ocorrem inúmeras alterações nos tecidos periodontais, pelo que se verifica: 1) a presença de inúmeras células inflamatórias, como os neutrófilos e linfócitos, no interior dos tecidos periodontais; 2) a migração apical do epitélio juncional, que leva à formação e estabelecimento de bolsas periodontais; 3) a perda óssea alveolar progressiva, que se pode traduzir em mobilidade dentária e na eventual perda destas peças dentárias; 4) após estas alterações, a resposta inflamatória mediada pelo hospedeiro culmina na destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar, assim como na rutura da arquitetura normal tecidual, pela formação de um tecido fibroso e denso (Muñoz-Carrillo et al., 2020; Page & Schroeder, 1976; Smith et al., 2010).

1.4 Evolução da Classificação das Doenças Periodontais e a nova Classificação das Doenças Periodontais e Peri-Implantais

O atual sistema de Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares é de extrema importância, não só para os Médicos Dentistas diagnosticarem e tratarem adequadamente os seus pacientes, mas também pelo seu papel na investigação da etiologia, patogénese, história natural e tratamento desta patologia (Caton et al., 2018).

Nos últimos 30 anos, a classificação da periodontite tem sido, frequentemente, modificada na tentativa de acompanhar as evidências científicas emergentes. Desde o Workshop de Classificação Internacional de 1999, que introduziu a “Classificação de Doenças e Condições Periodontais”, que se tornou evidente que as informações relativas à forma específica da periodontite, à gravidade e à extensão da destruição periodontal não eram suficientes para caracterizar o impacto desta patologia. Esta classificação permaneceu em vigor mais de 17 anos e dividia a periodontite em oito categorias: doenças gengivais; periodontite crónica; periodontite agressiva; periodontite como manifestação de doenças sistémicas; doenças periodontais necrosantes; abscessos do periodonto; periodontite associada a lesões endodônticas e defeitos e condições adquiridas ou de desenvolvimento (Armitage, 1999; Caton et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

Concluiu-se, então, que era necessário desenvolver uma nova estrutura de classificação da periodontite, uma vez que o seu diagnóstico clínico precisava de ser mais abrangente ao expressar os efeitos desta doença, assim como ter em consideração não só os seus efeitos orais, mas também possíveis implicações sistémicas. É, ainda, importante referir que esta classificação não disponha de uma categoria de doenças peri-implantares (Caton et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

O novo esquema de classificação do Workshop Mundial teve por base a análise de evidências de estudos populacionais e prospetivos, assim como de investigações científicas, pelo que surgiu a “Classificação de Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares” (Caton et al., 2018; Papanou et al., 2018). Esta classificação divide-se em quatro categorias: saúde periodontal, doenças e condições gengivais (Chapple et al., 2018; Trombelli et al., 2018); periodontite (Jepsen et al., 2018; Papanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018); outras condições que afetam o periodonto (Jepsen et al., 2018; Papanou et al., 2018); doenças e condições peri-implantares (Berglundh et al., 2018).

Considerando as evidências atuais referentes à fisiopatologia desta doença, a categoria “Periodontite” pode ser classificada em três formas distintas: Periodontite necrosante, Periodontite como uma manifestação direta de doenças sistêmicas e Periodontite (as formas anteriormente conhecidas como “Periodontite crônica” e “Periodontite agressiva”) (Caton et al., 2018; Papanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

Ao retificar a antiga classificação, decidiu-se que a estrutura da nova classificação da periodontite devia basear-se num sistema multidimensional de estádios e graus, para ser facilmente adaptada, à medida que surjam novas evidências (Caton et al., 2018).

O diagnóstico diferencial da periodontite é, atualmente, baseado nos sinais e sintomas específicos da periodontite necrosante, ou então, na presença/ausência de uma doença sistêmica incomum que altere a resposta imunitária do hospedeiro. A periodontite como manifestação direta de uma doença sistêmica deve seguir a classificação da doença primária, de acordo com a Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (Albandar et al., 2018; Jepsen et al., 2018). No entanto, a grande maioria dos casos de periodontite, não apresenta características locais da periodontite necrosante, ou características sistêmicas de um raro distúrbio imunológico como manifestação secundária de periodontite. Estes casos devem ser diagnosticados apenas como periodontite (Papanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

Os casos diagnosticados como periodontite são, posteriormente, classificados de acordo com o seu grau e estágio, uma vez que esta patologia dispõe de uma variedade de fenótipos que requerem diferentes abordagens por parte do clínico (Papanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018). Este sistema de classificação descreve a apresentação clínica da patologia, assim como outros elementos que afetem o tratamento e o prognóstico desta doença, que possam, potencialmente, ter consequências a nível da saúde oral e sistêmica. Desta forma, a mais recente classificação permite a incorporação de fatores individuais do paciente, durante o diagnóstico da patologia (Caton et al., 2018; Papanou et al., 2018).

Um sistema uniforme de estádios permite definir o estado da periodontite em vários pontos no tempo, pelo que pode auxiliar no tratamento e ser um fator na avaliação do prognóstico (Tonetti et al., 2018). O estágio depende, em grande parte, da severidade da doença na sua apresentação e da complexidade do seu tratamento. A classificação mediante o estágio, envolve quatro categorias (estádio I, estágio II, estágio III e estágio IV), sendo que cada estágio apresenta um pior prognóstico e tratamento mais complexo, em relação ao estágio anterior. Subdivide-se, ainda, em complexidade e extensão (Caton et al., 2018; Papanou et al., 2018). Estas características são determinadas após a avaliação

de diversas variáveis, incluindo a perda de inserção clínica, a quantidade e a percentagem de perda óssea visível radiograficamente, o tipo de perda óssea (vertical e/ou horizontal), a profundidade de sondagem, a presença e a extensão de defeitos de crista e de furca, a mobilidade dentária, a perda dentária associada à periodontite e, ainda, os fatores de complexidade presentes no estágio III e IV, que contribuem para o agravamento do estágio da periodontite (Caton et al., 2018; Tonetti et al., 2018) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação da Periodontite, mediante o estágio. Adaptado de (Tonetti et al., 2018).

ESTÁDIO DE PERIODONTITE		ESTÁDIO I	ESTÁDIO II	ESTÁDIO III	ESTÁDIO IV
SEVERIDADE	CAL INTERPROXIMAL	1 a 2 mm	3 a 4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	PERDA ÓSSEA RX	1/3 coronal (< 15%)	1/3 coronal (15 -30%)	Até 1/2 ou até 1/3 apical da raiz	Até 1/2 ou até 1/3 da raiz
	PERDA DENTÁRIA	Não existe perda dentária devido à periodontite		≤ 4 dentes perdidos devido à Periodontite	≥ 5 dentes perdidos devido à Periodontite
COMPLEXIDADE	LOCAL	• Máxima PS ≤ 4 mm • Perda óssea predominantemente horizontal	• Máxima PS ≤ 5 mm • Perda óssea predominantemente horizontal	<u>Em adição ao estágio II de complexidade:</u> • PS ≥ 6 mm • Perda óssea vertical ≥ 3 mm • Defeitos de furca (II ou III) • Defeitos de crista moderados	<u>Em adição ao estágio III de complexidade:</u> Necessidade de reabilitação complexa por: • Disfunção mastigatória • Trauma oclusal 2º (mobilidade ≥ 2) • Defeitos de crista severos • Colapso de mordida, má posição dentária, migração patológica • < 20 dentes remanescentes
EXTENSÃO E DISTRIBUIÇÃO		Para cada estágio, descrever a extensão como LOCALIZADA (<30% dos dentes envolvidos), GENERALIZADA ou PADRÃO MOLAR/INCISIVOS			

O grau subdivide-se em três níveis: grau A, que corresponde a uma taxa de progressão baixa; grau B, com uma taxa de progressão moderada; grau C, que representa uma taxa de progressão rápida (Tabela 2) (Caton et al., 2018).

O grau permite a classificação da periodontite com base em critérios primários, representados pela evidência direta ou indireta da sua progressão. Enquanto a evidência direta de progressão é baseada na informação longitudinal disponível, como por exemplo na forma de radiografias mais antigas, a evidência indireta de progressão baseia-se na avaliação da percentagem de perda óssea no dente mais comprometido da dentição, em função da idade do paciente. Por fim, é, ainda, relevante referir que alguns fatores de risco, como os hábitos tabágicos e a DM, constituem modificadores de grau, pelo que contribuem para a sua modificação. Se um indivíduo apresentar fatores de risco associados a uma maior progressão da doença ou a uma menor capacidade de resposta ao tratamento, as informações do fator de risco podem ser utilizadas para modificar a

estimativa do curso futuro da doença neste paciente (Caton et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

Por último, é pertinente referir que os clínicos devem abordar esta classificação partindo do pressuposto que a taxa de progressão dos seus pacientes é moderada, correspondente ao grau B. O grau apenas sofre alteações mediante as evidências diretas e indiretas de progressão (Tonetti et al., 2018).

Tabela 2. Classificação da Periodontite, mediante o grau. Adaptado de (Tonetti et al., 2018).

GRAU DE PERIODONTITE			GRAU A (Taxa de progressão baixa)	GRAU B (Taxa de progressão moderada)	GRAU C (Taxa de progressão rápida)
CRITÉRIOS PRIMÁRIOS	EVIDÊNCIA DIRETA DE PROGRESSÃO	Informação longitudinal (perda óssea rx ou CAL)	Evidência de nenhuma perda em 5 anos	< 2 mm em 5 anos	≥ 2 mm em 5 anos
	EVIDÊNCIA INDIRETA DE PROGRESSÃO	% perda óssea/idade	< 0.25	0.25 a 1	> 1
		Fenótipo do caso	Depósitos densos de biofilme com níveis baixos de destruição	Destruição proporcional com os depósitos de biofilme	Destruição excede o que seria expectável com os depósitos de biofilme / Padrões clínicos específicos sugestivos de períodos de rápida progressão e/ou doença de início precoce
MODIFICADORES DE GRAU	FATORES DE RISCO	Hábitos Tabágicos	Não fumador	< 10 cigarros/dia	> 10 cigarros/dia
		Diabetes	Normoglicémico	HbA1c < 7% em diabéticos	HbA1c ≥ 7% em diabéticos

1.5 Fatores de risco

Embora o principal fator etiológico que leva ao desenvolvimento da periodontite seja a elevada presença de bactérias gram-negativas anaeróbias nos tecidos mais profundos, há variações individuais na etiologia e no curso da doença, dado que a resposta imuno-inflamatória depende de fatores demográficos, sociais, ambientais, comportamentais, sistémicos e genéticos (Almeida et al., 2006; Hernández et al., 2012; Pihlstrom et al., 2005; Solomon et al., 2017). Verifica-se que alguns indivíduos aparentam ser mais suscetíveis ao desenvolvimento da periodontite que outros. Contudo, os fatores de risco atuam de forma muito pessoal, pelo que o mesmo conjunto de fatores que leva a uma maior suscetibilidade para a periodontite num indivíduo, pode não ser o mesmo noutras pessoas (Genco, 1996; Solomon et al., 2017; Stabholz et al., 2010).

Um fator de risco pode definir-se como uma característica ou ocorrência associada ao aumento da taxa de incidência de uma determinada doença. Quer isto dizer que este fator tem um efeito prejudicial direto, ao potencializar ou aumentar a probabilidade do desenvolvimento da doença (Darby, 2022; Dyke & Dave, 2005). Apesar dos fatores de risco estarem associados a uma doença, não implicam que sejam a sua causa (Darby, 2022; Genco, 1996).

Estima-se que a progressão da doença periodontal seja o resultado da interação entre múltiplos fatores de risco (Darby, 2022). Estes podem ser classificados em modificáveis ou não modificáveis. Relativamente aos primeiros, estes são, geralmente, de natureza ambiental ou comportamental, enquanto os fatores de risco não modificáveis são intrínsecos ao indivíduo e, por essa mesma razão, não conseguem ser facilmente alterados (Dyke & Dave, 2005; Genco, 1996).

No que concerne aos fatores de risco modificáveis, incluem-se, por exemplo, os microrganismos específicos, o deficiente controlo de placa bacteriana, o tabagismo e a DM. Por outro lado, os fatores de risco não modificáveis compreendem a predisposição genética, a resposta imunitária, a idade, o género, a raça/etnia, entre outros (Genco, 1996; Pihlstrom et al., 2005; Solomon et al., 2017).

Atendendo que o tabagismo e a DM são considerados como os principais fatores de risco para o desenvolvimento da periodontite, o Médico Dentista deve instruir os seus pacientes relativamente ao papel que desempenham nesta doença e incentivá-los a cessarem o hábito tabágico e a controlarem a DM (tomar regularmente a medicação prescrita, ir a consultas frequentes do médico especialista, avaliar os níveis de hemoglobina glicada, etc) (Darby, 2022; Dyke & Dave, 2005; Pihlstrom et al., 2005; Solomon et al., 2017).

No que diz respeito à vertente genética, inúmeros estudos evidenciam uma associação entre determinados polimorfismos e a patogénese desta doença. No entanto, a influência de alguns polimorfismos ainda não é clara, pelo que são necessários mais estudos (Stabholz et al., 2010).

1.6 Prevalência da doença periodontal

A doença periodontal constitui um problema de saúde pública, dada a sua elevada prevalência mundial. No entanto, as estimativas da sua prevalência variam amplamente entre inúmeros estudos (Papanou et al., 2018).

Esta grande variação deve-se à inconsistência dos critérios utilizados em cada estudo, nomeadamente as diferenças verificadas no tamanho das amostras, no grupo etário escolhido, na raça e nas condições socioeconómicas da população estudada, nos critérios utilizados para diagnosticar a doença, na duração do estudo, entre outros. Sendo assim, é possível afirmar que um dos maiores desafios neste tipo de investigações epidemiológicas reside em recorrer a critérios universalmente aceites (Machado et al., 2020; Nazir et al., 2020).

Verifica-se que a doença periodontal atinge tanto países desenvolvidos, como países em desenvolvimento, e estima-se que afete cerca de 15-20% da população mundial (Luchian et al., 2022). Os dados epidemiológicos facultados pela Organização Mundial de Saúde sugerem que a prevalência e a gravidade desta doença tendem a ser mais elevadas nos grupos etários mais velhos, quando comparados com grupos etários mais jovens. Vários estudos sugerem, ainda, que o género masculino e indivíduos de raça negra são mais propensos a desenvolver esta doença (Khuda et al., 2021; Nazir, 2017; Petersen & Ogawa, 2005).

Nas duas últimas décadas, a prevalência da doença periodontal aumentou cerca de 57.3% a nível mundial, o que faz com que seja urgente e necessário aplicar estratégias de prevenção, de forma a reduzir a sua elevada incidência e prevalência. É importante realçar que esta doença acarreta inúmeras consequências que podem afetar não só a função mastigatória e a estética, mas também a saúde geral e a qualidade de vida dos indivíduos por ela afetados (Machado et al., 2020; Nazir, 2017; Papanou et al., 2018).

Relativamente aos dados obtidos em Portugal, num estudo conduzido por Machado et al. (2020), verificou-se que a prevalência da periodontite foi superior à média mundial entre 2004 e 2017, sendo que em 2017 excedeu os valores mundiais por 8.5%.

2. Marcadores inflamatórios na periodontite

2.1 Caracterização das metaloproteinases de matriz (MMPs)

A saúde periodontal requer um equilíbrio entre as enzimas responsáveis pela destruição tecidual, como as metaloproteinases de matriz (MMPs) e os seus inibidores (Holla et al., 2012; Murthykumar et al., 2019; Rai et al., 2008; Weng et al., 2016). As MMPs constituem uma família de enzimas estruturalmente relacionadas, mas geneticamente distintas, capazes de degradar quase todas as proteínas da matriz extracelular (MEC), incluindo o colagénio, elastina, lamina, fibronectina, gelatina, glicoproteínas de matriz e proteoglicanos e, ainda, proteínas não matriciais (Emingil et al., 2014; Khuda et al., 2021; Majumder et al., 2019; Sorsa et al., 2016, 2018; Uitto et al., 2003).

As MMPs são endopeptidases dependentes de cálcio e zinco, que desempenham um papel crucial em vários processos biológicos, nomeadamente na proliferação celular, remodelação de tecidos, cicatrização de feridas, morfogénese, angiogénese e apoptose. Apesar de serem essenciais nestes processos fisiológicos, também estão associadas a patologias, como é o caso da periodontite e da artrite reumatóide (Al-Majid et al., 2018; Hernández et al., 2021; Khuda et al., 2021; Li et al., 2016; Luchian et al., 2022; Weng et al., 2016).

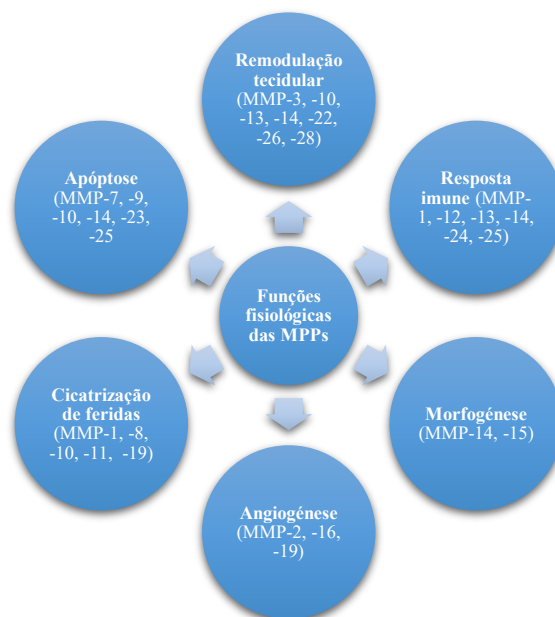


Figura 1. Funções das MMPs. Adaptado de (Khuda et al., 2021).

Até à data identificaram-se 28 membros desta família, em que 25 se encontram presentes em humanos e que se podem dividir em cinco grupos, de acordo com a sua especificidade de substrato (Li et al., 2016; Luchian et al., 2022; Sorsa et al., 2016; Yan & Boyd, 2007). Estes grupos incluem as **colagenases** (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), que degradam o colagénio em gelatina; as **gelatinases** (MMP-2 e MMP-9), que degradam a gelatina; as **estromelisinases** (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), que degradam o colagénio, a gelatina e certas glicoproteínas; as MMPs do **tipo membranar** (MT-MMPs) (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25) e outras MMPs não classificadas (Hernández-Ríos et al., 2016; Li et al., 2016; McCrudden et al., 2016). A maioria destas MMPs é secretada na sua forma pró-inativa e são subsequentemente processadas por outras enzimas proteolíticas durante o processo inflamatório, de modo a gerar formas ativas (Al-Majid et al., 2018; Franco et al., 2017; Holla et al., 2012; Murthykumar et al., 2019; Uitto & Raeste, 1978).

A atividade das MMPs ou matrixinas é regulada por inibidores endógenos, os inibidores de metaloproteinases tecidulares (TIMPs), pelo que alterações na homeostase entre MMPs e TIMPs podem levar à progressão da doença/inflamação (Alotaibi et al., 2020; Hernández-Ríos et al., 2016; de Moraes et al., 2018; Sorsa et al., 2016; Tsai et al., 2017).

Em condições fisiológicas, as MMPs são fortemente reguladas e desempenham um papel fundamental na remodelação da MEC e na reparação tecidular. O ligamento periodontal é protegido do ataque proteolítico mediado pelas MMPs por meio dos TIMPs (Chou et al., 2011; Heikkinen et al., 2016; Ingman et al., 1994; Lee et al., 1995).

Por outro lado, quando se verificam condições patológicas, deixa de haver um equilíbrio na regulação da atividade das MMPs (Emingil et al., 2014; Luchian et al., 2022; de Moraes et al., 2018). As MMPs degradam, então, os componentes da matriz extracelular, da membrana basal e de serpinas protetoras, contribuindo para alterações significativas nas citocinas, na ativação dos osteoclastos, na regeneração tecidular e na perda de inserção do tecido conjuntivo (Khuda et al., 2021; Murthykumar et al., 2019; Tsai et al., 2017). Em situações patogénicas os níveis dos TIMPs são baixos e, portanto, inadequados para inibir a atividade das MMPs. Além disto, ocorre, ainda, a mobilização e ativação de células inflamatórias, como os linfócitos e os neutrófilos, a alteração de imunomoduladores e a secreção de proteases inflamatórias (Alotaibi et al., 2020; Al-Majid et al., 2018; Hernández et al., 2012; Khuda et al., 2021; Rai et al., 2008).

Na periodontite, as MMPs são ativadas durante a inflamação e induzem a degradação excessiva da MEC, do ligamento periodontal e do osso alveolar, o que pode levar à perda de peças dentárias (Birkedal-Hansen, 1993; Ingman et al., 1994; Lee et al., 1995; Tsai et al., 2017; Uitto et al., 2003).

É, ainda, importante referir que a destruição periodontal é causada pela collagenase intersticial MMP-8 e não pelas enzimas bacterianas (Al-Majid et al., 2018; Umeizudike et al., 2022). No entanto, as bactérias presentes ao nível da placa bacteriana são capazes de estimular as células hospedeiras a secretarem MMPs, o que resulta num dos mecanismos indiretos de destruição tecidular associados à periodontite (Checchi et al., 2020; Luchian et al., 2022; Tsai et al., 2017). Por esta razão, uma melhor compreensão da regulação da atividade das MMPs, em condições fisiológicas e patológicas, é importante para caracterizar as diferentes formas da periodontite (Marcaccini et al., 2010; Yan & Boyd, 2007).

Durante o processo inflamatório da doença periodontal, o periodonto sofre uma destruição que resulta no aumento dos níveis de vários tipos de enzimas proteolíticas nos tecidos, incluindo as MMPs. Embora várias MMPs tenham uma contribuição significativa para a progressão da doença periodontal (como as MMP-2, -7 e -14), as matrixinas mais associadas à condição patológica periodontal são as collagenases (Khuda et al., 2021; Sorsa et al., 1990, 2016; Uitto & Raeste, 1978). Como as collagenases intersticiais são as únicas proteases do hospedeiro capazes de degradar a tripla hélice do colagénio tipo I, II e III, também estão associadas ao início da degradação proteolítica que ocorre na periodontite (Ingman et al., 1994; Uitto & Raeste, 1978; Sorsa et al., 1990).

Evidências significativas sugerem que estas enzimas compreendem a via mais importante da destruição tecidular associada à periodontite, devido ao seu papel na degradação patológica do colagénio, que é a principal proteína estrutural da MEC (Checchi et al., 2020; Li et al., 2016; Majumder et al., 2019; Murthykumar et al., 2019).

Estas matrixinas podem, ainda, atuar por meio da regulação de outras cascatas de ativação de MMPs. Este mecanismo poderá até ser mais significativo na destruição do tecido periodontal do que na atividade collagenolítica direta, uma vez que uma mudança subtil na regulação destas enzimas pode resultar numa ativação generalizada de MMPs e, consequente destruição tecidual (Hernández et al., 2012; Luchian et al., 2022).

Apesar de se estar a dar um especial realce ao papel das MMPs na periodontite, estas também atuam em várias outras doenças crónicas inflamatórias, como é o caso da artrite reumatóide, psoríase, aterosclerose e doença de Crohn. O sistema imunitário

produz uma resposta inflamatória excessiva e prolongada, que resulta na ativação das MMPs. Como estas enzimas contribuem para a degradação dos componentes da matriz celular, levam à destruição da integridade estrutural do tecido afetado e ao desenvolvimento da doença crônica. As MMPs estão, também, envolvidas no processo de recrutamento e ativação de células do sistema imunitário, como os neutrófilos e macrófagos, e na liberação de citocinas pró-inflamatórias, que amplificam ainda mais a resposta inflamatória do organismo e contribuem para a progressão da doença (Khuda et al., 2021; Luchian et al., 2022; Manicone & McGuire, 2008).

2.2 MMP-8

As collagenases são enzimas capazes de destruir a conformação em tripla hélice do colagénio e, assim, iniciar a sua degradação. A primeira collagenase descrita foi isolada de leucócitos polimorfonucleares humanos em 1968 e foi chamada de PMNL-collagenase ou collagenase de neutrófilos. Posteriormente, descobriu-se que esta enzima também fazia parte da matriz extracelular noutros tecidos e, nesse sentido, recebeu o nome de metaloproteinase de matriz 8 (MMP-8). Após a descoberta de uma terceira forma de collagenase humana (MMP-13), a collagenase de neutrófilos ou MMP-8 tornou-se comumente referida como collagenase 2 (Luchian et al., 2022; McCrudden et al., 2016; Khuda et al., 2021).

Esta enzima é sintetizada durante a diferenciação de granulócitos na medula óssea e é armazenada, intracelularmente, como uma pró-enzima latente em grânulos específicos de leucócitos polimorfonucleares (Marcaccini et al., 2010; Murthykumar et al., 2019). Estes grânulos são ativados e secretados seletivamente juntamente com mediadores pró-inflamatórios, em resposta à inflamação, desencadeada pela presença de bactérias periodontopatogénicas e respetivos fatores de virulência (Al-Majid et al., 2018; Holla et al., 2012; Luchian et al., 2022).

A MMP-8 é produzida, principalmente, por neutrófilos, mas também por outras células, nomeadamente endoteliais, epiteliais, plasmáticas, ósseas, macrófagos e fibroblastos gengivais (Chou et al., 2011; Franco et al., 2017; Hernández et al., 2012; Hernández-Ríos et al., 2016; Khuda et al., 2021; Passoja et al., 2008; Sorsa et al., 1994). Na periodontite, os neutrófilos são a principal fonte de collagenase, mas as células epiteliais também têm um papel considerável. Estas podem produzir níveis elevados de

MMP-8, que podem facilitar não só a migração apical e a extensão lateral do epitélio juncional, mas também a subsequente perda de inserção do tecido conjuntivo (Murthykumar et al., 2019; Sorsa et al., 2018). O papel dos fibroblastos também é importante, uma vez que são responsáveis pela produção de componentes da matriz extracelular e, como são capazes de secretar a MMP-8, podem levar à degradação do tecido periodontal (Luchian et al., 2022).

A MMP-8 é sintetizada na sua forma pró-inativa, devido à interação do resíduo de cisteína a nível do pró-domínio, com o íon de zinco do domínio catalítico. Esta interação é conhecida por “interruptor de cisteína”. A interrupção desta interação envolve uma alteração na conformação da enzima, através da remoção proteolítica do pró-domínio, que resulta na exposição do domínio catalítico e, conseqüentemente, na ativação da MMP-8. Após a sua ativação, não só é capaz de hidrolisar o colagénio, como também hidrolisar outros substratos, como peptídeos gelatinosos, fibronectina, proteoglicanos, fibrinogénio e inibidores de serpina (Luchian et al., 2022; Murthykumar et al., 2019; Passoja et al., 2008; Sorsa et al., 2016).

A atividade da MMP-8 é regulada por múltiplos mecanismos, como a ativação proteolítica já mencionada, a presença de vários inibidores e vias de sinalização. Especificamente na periodontite, a sua atividade é responsável pela degradação do colagénio tipo I, que é o principal componente das fibras do ligamento periodontal, mas também pela degradação do colagénio tipo III, que se encontra presente nas fibras reticulares do ligamento periodontal (Chou et al., 2011; Ingman et al., 1994; Sorsa et al., 2016, 2020; Umezudike et al., 2022). Estes tipos de colagénio são responsáveis por cerca de 60% do conteúdo do tecido conjuntivo gengival, no periodonto saudável. Assim, a síntese e ativação da MMP-8 são etapas importantes na destruição patológica da matriz extracelular, associada à periodontite (Ingman et al., 1994; Murthykumar et al., 2019; Rai et al., 2008).

Acredita-se que o aumento descontrolado da expressão, libertação e ativação da MMP-8, juntamente com outras MMPs e proteinases, possa induzir a inflamação associada à destruição tecidual na periodontite, assim como noutras doenças inflamatórias (Khuda et al., 2021; Luchian et al., 2022).

A MMP-8 está envolvida na destruição irreversível dos tecidos moles e duros, e por isso associada ao desenvolvimento de bolsas e à perda de inserção periodontal, pelo que leva, eventualmente, à perda dentária (Hernández et al., 2012; Sorsa et al., 2018). Posto isto, é considerada um mediador chave do processo de degradação tecidual do

periodonto (Ingman et al., 1994; Rai et al., 2008; Séguier et al., 2001). Níveis elevados de MMP-8 em fluidos orais, especialmente na sua forma ativa (aMMP-8), estão altamente associados com a inflamação e refletem a doença periodontal, especialmente nas fases clínicas ativas (Al-Majid et al., 2018; Hernández-Ríos et al., 2016; de Moraes et al., 2018; Sorsa et al., 2016). A forma ativa demonstrou, ainda, ter uma associação mais forte com o estado periodontal, permitindo uma maior precisão no diagnóstico desta patologia, comparativamente à sua forma total ou latente (Lee et al. 1995; Sorsa et al., 2016, 2018).

Numerosos estudos demonstram uma relação entre a MMP-8 e o início e progressão da periodontite, sugerindo que níveis elevados desta enzima são capazes de refletir a gravidade e o curso da doença, assim como a resposta ao tratamento (Chou et al., 2011; Heikkinen et al., 2016; Lee et al., 1995; Luchian et al., 2022; Sorsa et al., 2006). Paradoxalmente, para além dos efeitos destrutivos a nível dos tecidos, pode, também, exercer uma atividade anti-inflamatória de defesa do organismo, processando quimiocinas e citocinas de natureza anti-inflamatória (Holla et al., 2012; Murthykumar et al., 2019; Sorsa et al., 2018; Takashiba & Naruishi, 2006; Tsai et al., 2017). Assim, níveis fisiológicos basais estão associados à homeostase tecidular (Hernández et al., 2012; Sorsa et al., 2016, 2020; Umezudike et al., 2022).

De facto, a MMP-8 tem sido referida como um dos biomarcadores mais promissores para a periodontite em fluidos orais e, conjuntamente com a MMP-9, é a MMP mais abundante nos tecidos periodontais (Franco et al., 2017; Luchian et al., 2022; Romero-Castro et al., 2020). Adicionalmente, a MMP-8 também exerce a função de mediador noutras doenças crónicas inflamatórias, nomeadamente na artrite reumatóide, asma, cancro oral, aterosclerose e artrose (Al-Majid et al., 2018; Khuda et al., 2021; Séguier et al., 2001; Umezudike et al., 2022).

2.3 MMP-8 como um biomarcador na periodontite

O diagnóstico precoce da periodontite é muito importante para o planeamento do tratamento. No entanto, atualmente, o diagnóstico da periodontite ainda depende de métodos de diagnóstico tradicionais, que incluem a profundidade de sondagem, verificação do nível de inserção periodontal (NIP), hemorragia à sondagem, índice de placa, índice gengival e avaliação radiográfica (Hernández et al., 2012, 2021; Khuda et al., 2021; Reddy et al., 1997; Sorsa et al., 2018, 2020). Como Tonetti et al. descrevem,

existem algumas limitações em relação à utilização destes métodos tradicionais para o diagnóstico da periodontite. Não só são invasivos e demorados, como também apenas são capazes de fornecer evidências em relação à destruição tecidual passada, e não em relação à sua atividade, extensão e padrão de progressão atuais (Hernández et al., 2021; Khuda et al., 2021; Sorsa et al., 2018, 2020; Umezudike et al., 2022). Quer isto dizer que estes métodos também têm uma baixa sensibilidade para detetar a periodontite nos seus estádios iniciais. Adicionalmente, alguns destes métodos são altamente influenciados pelo treino e experiência do profissional de saúde, pelo que irá haver variações entre diferentes operadores. Há, ainda, a considerar que a destruição do periodonto nem sempre segue um padrão previsível ou linear, que possa ser medido com precisão através da perda óssea radiográfica e/ou perda de inserção periodontal (Hernández et al., 2021; Sorsa et al., 2020; Umezudike et al., 2022).

Os métodos de diagnóstico, idealmente, deveriam ser capazes de poder identificar indivíduos e as localizações dentárias mais suscetíveis à patologia, de prever o grau de destruição futura e de monitorizar a resposta à terapia periodontal. Contudo, estes métodos ainda estão a ser desenvolvidos (Heikkinen et al., 2016; Hernández et al., 2021; Khuda et al., 2021). Para estes novos métodos de diagnóstico, o papel dos biomarcadores moleculares é muito importante, uma vez que podem aumentar a precisão do diagnóstico precoce da periodontite e, provavelmente, contribuir para uma melhor avaliação do grau e estágio desta patologia. De notar que a potencial incorporação de biomarcadores válidos foi recentemente proposta no último sistema de classificação periodontal (Hernández et al., 2012, 2021; Tonetti et al., 2018).

De facto, no último sistema de Classificação de Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares, ficou como recomendação a necessidade do desenvolvimento e validação de ferramentas de diagnóstico não invasivas, como a inclusão de biomarcadores, de forma a preencher a lacuna existente no diagnóstico periodontal (Papanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018; Umezudike et al., 2022). Esta recomendação tem em vista melhorar o diagnóstico precoce do risco de degradação periodontal, pelo que vai auxiliar, principalmente, a identificar indivíduos suscetíveis e a prever o risco de progressão futura (Chapple et al., 2018; Hernández et al., 2012; Khuda et al., 2021; Sorsa et al., 1990, 2016, 2020).

Têm-se feito estudos para identificar biomarcadores adequados para o diagnóstico da periodontite e, um dos mais promissores, é indubitavelmente a MMP-8. Pensa-se que a MMP-8 poderá ser utilizada para prever, diagnosticar e classificar a doença periodontal,

bem como para avaliar as fases de destruição ativas e de latência, monitorizar a eficácia do tratamento e definir o período ideal entre as consultas de tratamento periodontal de suporte (Franco et al., 2017; Hernández et al., 2012; Sorsa et al., 2018, 2020). Por isso, a MMP-8 já é considerada como um potencial biomarcador para o diagnóstico clínico (em consulta) de pacientes com periodontite (Hernández-Ríos et al., 2016; Khuda et al., 2021; Luchian et al., 2022; Murthykumar et al., 2019).

Uma quantidade significativa e, cada vez maior de publicações internacionais tem, repetidamente e consistentemente, evidenciado que os níveis da colagenase MMP-8 no fluido crevicular gengival (FCG) estão relacionados com a patologia do periodonto, ou seja, com o estado de saúde periodontal, gengivite e periodontite (Chou et al., 2011; Heikkinen et al., 2016; Luchian et al., 2022; Sorsa et al., 2018, 2020). Demonstrou-se a existência de uma correlação positiva entre a atividade da aMMP-8 (MMP-8 ativa) nos fluidos orais e a profundidade das bolsas periodontais, assim como a hemorragia à sondagem e a perda de suporte do tecido periodontal (Al-Majid et al., 2018; Khuda et al., 2021; Luchian et al., 2022; Sorsa et al., 2016).

Os estudos de Alassiri et al. (2018), Kiili et al. (2002), Lee et al. (1995), Romanelli et al. (1999) e Sorsa et al. (2006, 2016) demonstram que a presença de níveis elevados de aMMP-8 em fluidos orais permite diferenciar a periodontite da gengivite. A diferença entre os níveis de aMMP-8 e MMP-8 total (tMMP-8) é imprescindível, uma vez que reflete o grau de destruição da MEC que ocorre a nível dos tecidos periodontais. Enquanto níveis elevados de aMMP-8 são um indicador específico da periodontite, níveis elevados de MMP-8 total podem ser encontrados tanto em pacientes com periodontite, como com gengivite (Al-Majid et al., 2018; Hernández et al., 2021; Sorsa et al., 2018).

A subida dos níveis de aMMP-8 no FCG precede a perda de inserção periodontal, o que significa que está a ocorrer uma degradação contínua da MEC e que, provavelmente, irá ocorrer uma perda de inserção periodontal no futuro. Desta forma, a medição dos níveis de aMMP-8 no FCG pode ser bastante útil para o diagnóstico precoce e prognóstico da periodontite. Assim, a destruição ativa do tecido periodontal associada a uma elevação patológica dos níveis de aMMP-8 pode ser identificada, de uma forma não invasiva, nos fluidos orais (Al-Majid et al., 2018; Franco et al., 2017; Hernández-Ríos et al., 2016; Murthykumar et al., 2019; Sorsa et al., 2016, 2018, 2020; Zhang et al., 2018).

O estudo de Gupta et al. (2023) mostrou uma forte associação entre a aMMP-8 e a periodontite subclínica, pelo menos duas vezes superior à do método clínico tradicional

de hemorragia à sondagem. Concluíram, por isso, que este novo método poderia reduzir o risco de subtratamento da periodontite (Umeizudike et al., 2022).

A nível salivar e oral, aMMP-8/MMP-8 também poderá ser um ótimo biomarcador, uma vez que os seus níveis são significativamente mais elevados em pacientes com periodontite, comparativamente aos pacientes sem a doença. No entanto, a combinação da deteção de aMMP-8/MMP-8 e de interleucina 6 (IL-6) parece ser mais fiável como marcador de diagnóstico salivar (Sorsa et al., 2018, 2020).

Embora os biomarcadores possam fornecer informações clínicas adjuvantes relevantes, pelo que a sua aplicação deverá ser considerada no futuro, atualmente, o exame clínico periodontal continua a ser necessário, uma vez que ainda não pode ser substituído por nenhum outro meio de diagnóstico periodontal (Hernández et al., 2012; Umeizudike et al., 2022).

3. Polimorfismos genéticos

3.1 Definição de polimorfismo

Polimorfismo genético pode ser definido como a presença de duas ou mais variantes de uma sequência nucleotídica específica de DNA, que pode ocorrer entre diferentes indivíduos ou populações (Kinane et al., 2005; Teama, 2018).

Na espécie humana, diploide, as duas diferentes formas de um gene, também denominadas de variantes alélicas ou alelos, podem diferir na sua sequência de nucleótidos. Desta forma, o polimorfismo genético traduz-se numa diferença na sequência de DNA entre indivíduos, grupos ou populações, em que o alelo menos comum ocorre em pelo menos 1% da população. As diferenças na sequência de nucleótidos mais frequentes referem-se apenas a um único par de bases, mas também podem ser diferenças em vários pares de bases ou sequências repetidas (Ismail & Essawi, 2012; Kinane & Hart, 2003; Kinane et al., 2005; Teama, 2018).

Ao contrário das mutações, os polimorfismos genéticos são geralmente considerados variantes normais na população. A principal diferença entre uma mutação e um polimorfismo genético reside na frequência e origem da variação, na sequência de DNA. Uma mutação corresponde a uma alteração na sequência do DNA, que geralmente

é rara, e pode ocorrer espontaneamente ou ser o resultado da exposição a certos fatores externos, como a radiação, por exemplo. As mutações, com prevalência inferior a 0.1% da população mundial, podem ter numerosos efeitos na sobrevivência e reprodução do organismo (Kinane & Hart, 2003; Kinane et al., 2005; Ismail & Essawi, 2012).

Alelos diferentes do mesmo gene podem produzir proteínas idênticas ou diferentes, designadas por isoformas. A alteração de um nucleótido numa variante alélica pode, ou não, modificar o aminoácido codificado por um codão. Quando o polimorfismo genético ocorre na região codificante de um gene e não modifica o aminoácido, esta alteração é considerada "silenciosa" ou "sinónima" e, geralmente, não tem qualquer consequência biológica. O facto de existirem "codões sinónimos", ou seja, codões que codificam o mesmo aminoácido resultante da redundância do código genético, faz com que o novo codão originado possa codificar o mesmo aminoácido, apesar da alteração de um dos nucleótidos. Quando a mudança é considerada "não silenciosa" ou "não sinónima", as alterações ocorrem em regiões codificantes do gene, e a modificação do nucleótido resulta em alterações na sequência de aminoácidos da proteína produzida. Como consequência, os polimorfismos genéticos podem alterar (ou não) a função e estrutura da proteína, dando origem a proteínas disfuncionais que alteram características fenotípicas de um indivíduo (Kinane & Hart, 2003; Kinane et al., 2005).

Os produtos proteicos específicos dos dois alelos polimórficos de um mesmo gene podem funcionar de formas diferentes, podendo esta alteração funcional ser exacerbada pela exposição a certos fatores, nomeadamente pela dieta, pelo tabagismo ou por fatores bacterianos. Certos polimorfismos genéticos podem aumentar ou diminuir o risco de uma pessoa contrair uma determinada doença, se a proteína afetada pertencer a um processo biológico, como a resposta inflamatória a um agente microbiano específico. A contribuição de um alelo para uma certa enfermidade, depende da magnitude do seu efeito em promover o desenvolvimento da doença. As diferenças alélicas determinam a variabilidade genética entre indivíduos (Kinane & Hart, 2003; Kinane et al., 2005).

Os tipos de variantes genéticas que contribuem para doenças complexas são, comumente, os polimorfismos genéticos. Todavia, na maioria dos casos, esta associação não constitui uma relação causa-efeito. De facto, certos alelos estão frequentemente correlacionados com indivíduos que padecem de uma determinada enfermidade, quando comparados com pacientes controlo. Contudo, não existe uma correlação direta entre a presença de um alelo específico e a ocorrência de uma doença. É importante realçar que alelos relacionados com uma determinada patologia também se

encontram presentes em indivíduos não afetados por essa mesma doença. Do mesmo modo, indivíduos que padecem da doença nem sempre possuem o alelo específico associado. Assim sendo, a presença do alelo associado a uma determinada patologia num certo indivíduo, não pode inferir o diagnóstico dessa mesma doença (Kinane & Hart, 2003).

Efetivamente, os polimorfismos genéticos contribuem para o processo de uma determinada doença. Não obstante, esta contribuição é apenas relativa e, em determinadas situações, são necessários diversos polimorfismos para se desenvolver o fenótipo da doença em causa. A etiologia de numerosas patologias é altamente complexa, pelo que é extremamente difícil quantificar as contribuições específicas dos múltiplos componentes nela envolvidos, incluindo o efeito das variantes genéticas. Consequentemente, o significado clínico de um indivíduo que apresenta um determinado polimorfismo genético associado a uma determinada doença, ainda não é claro (Kinane & Hart, 2003; Kinane et al., 2005).

As variações genéticas podem estar presentes em um ou mais locais de um gene, pelo que as alterações funcionais que possam vir a ocorrer vão depender dessas localizações. Assim, os polimorfismos dos genes humanos podem-se encontrar a nível da região promotora, dos exões ou regiões codificantes, a nível dos intrões ou sequências intervenientes e, ainda, a nível das 5' e 3'-*Untranslated Transcribed Region* do RNA mensageiro (mRNA) (5' e 3'-UTR) (Jaber et al., 2004; Takashiba & Naruishi, 2006). Se o polimorfismo se encontrar no promotor, pode afetar a atividade transcricional, que se pode expressar pela quantidade de proteínas sintetizadas pelo gene em questão, o que, por sua vez, pode afetar a sua função (Jaber et al., 2004; Kinane et al., 2005). Se o polimorfismo se encontrar na região codificante de um gene, podem-se verificar dois cenários distintos. No primeiro cenário, ocorre uma alteração silenciosa que não afeta a função da proteína, enquanto no segundo cenário, em que a alteração não é silenciosa, a função da proteína pode ser afetada. Por outro lado, no caso do polimorfismo se encontrar no intrão, o processo de *splicing* pode ser afetado de várias formas, nomeadamente criando novos locais de clivagem ou alterando o reconhecimento dos locais de clivagem já existentes. Estas alterações podem provocar a inclusão ou exclusão de exões na molécula final do mRNA, que irá afetar a sequência de aminoácidos da proteína produzida e, eventualmente, a sua funcionalidade. Por fim, caso o polimorfismo ocorra a nível da região 3'-*Untranslated Transcribed Region* do mRNA pode afetar a estabilidade do mRNA e, consequentemente, a sua semi-vida, o que diminui a quantidade de proteína

expressa. A ocorrência de um polimorfismo nesta região pode, ainda, alterar a regulação da tradução mRNA a nível dos ribossomas (Jaber et al., 2004; Kinane & Hart, 2003; Kinane et al., 2005; Takashiba & Naruishi, 2006; Teama, 2018).

A variabilidade genómica pode estar presente em diversas formas, tais como polimorfismos de nucleótido único (SNPs), polimorfismos de inserção e deleção, variações *copy number* (CNV) e polimorfismos do tipo repetitivo em *tandem*. Quando se encontram sobre esta última forma, dividem-se em microssatélites de *short tandem repeat* (STR) e em minissatélites de *variable number of tandem repeats* (VNTR) (Ismail & Essawi, 2012; Jaber et al., 2004; Teama, 2018). Os polimorfismos genéticos podem ser utilizados como marcadores moleculares, mas também para o mapeamento de doenças e para a farmacogenética (Ismail & Essawi, 2012; Takashiba & Naruishi, 2006; Teama, 2018).

3.2 Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Numa população, as moléculas de DNA com os diferentes alelos de um mesmo gene têm sequências de nucleótidos diferentes, num determinado local do gene. As diferenças incluem substituições, inserções e exclusões de nucleótidos. No caso de substituição de um nucleótido, este pode ser substituído por qualquer um dos restantes 3 tipos de nucleótidos. Por exemplo, na mesma população, algumas moléculas de DNA podem ter um par de bases timina-adenina (T)-(A) num determinado local, enquanto outras têm o par de bases citosina-guanina (C)-(G), nesse mesmo local. Esta diferença constitui um polimorfismo de nucleótido único (Ismail & Essawi, 2012; Matsuda, 2017; Teama, 2018).

O SNP caracteriza-se, então, pela substituição de um único nucleótido num local específico do gene, em que, para dois alelos diferentes, podem existir três genótipos distintos, em indivíduos da mesma população (Brookes, 1999; Emingil et al., 2014; Takashiba & Naruishi, 2006; Teama, 2018; Yousefi et al., 2018).

Os SNPs têm sido vastamente estudados devido à sua importância a nível da variação, adaptação e evolução do genoma humano. Podem ainda ser um marcador genético bastante útil em estudos evolutivos, no mapeamento de doenças humanas e na genética de populações, devido à sua grande abundância e estabilidade. A identificação de SNPs pode, ainda, contribuir para um diagnóstico prévio e terapia personalizada

(Brookes, 1999; Leaché & Oaks, 2017; Matsuda, 2017; Teama, 2018; Yousefi et al., 2018).

SNPs constituem a forma mais comum de polimorfismos no genoma humano, uma vez que ocorrem em pelo menos 1% da população mundial. Para além de conferirem diversidade entre indivíduos, são relevantes para a predisposição genética e patogénese de determinadas patologias, nomeadamente para a periodontite (Ismail & Essawi, 2012; Leaché & Oaks, 2017; Matsuda, 2017; Teama, 2018; Yousefi et al., 2018).

Segundo os dados disponíveis na literatura, estima-se que existam cerca de 10 milhões de SNPs no genoma humano. Considera-se, também, que o genoma de um indivíduo apresente cerca de 4 a 5 milhões de SNPs, uma vez que, em média, se estima que ocorra um SNP a cada 300 nucleótidos (Brookes, 1999; Ismail & Essawi, 2012; Kinane et al., 2005). A maior parte dos SNPs estão em regiões não codificantes do genoma, devido ao facto de apenas uma pequena porção do genoma codificar proteínas (Ismail & Essawi, 2012; Kinane & Hart, 2003; Kinane et al., 2005; Teama, 2018).

Algumas regiões do genoma apresentam mais SNPs, comparativamente a outras, sendo que estes se situam em regiões entre os genes (intergénicas), mas também dentro do próprio gene (intragénicas) (Teama, 2018). Em alguns casos, a forma variante de um gene pode conferir uma vantagem evolutiva a uma determinada espécie e, eventualmente, acabar por ser incorporada no DNA da maioria dos seus elementos. Os efeitos desta forma variante, podem ser tanto benéficos, como prejudiciais, dependendo das circunstâncias presentes. Maioritariamente, ambas as formas (progenitora e variante) sobrevivem e coexistem na população da espécie, o que leva a polimorfismos genéticos, incluindo os SNPs (Ismail & Essawi, 2012).

A deteção de SNPs é indispensável para a compreensão da base genética de doenças complexas, pelo que os métodos utilizados devem ser altamente específicos e sensíveis. A grande maioria requer a análise de padrões de fragmentos de DNA resultantes da hidrólise por enzimas de restrição, que reconhecem e hidrolisam sequências específicas de DNA (Ismail & Essawi, 2012; Matsuda, 2017).

4. Associação dos polimorfismos genéticos e a periodontite

4.1 O papel da genética na periodontite

A variação genética e as exposições ambientais constituem os principais determinantes das diferenças fenotípicas entre indivíduos (Darby, 2022; Holla et al., 2012). A população humana apresenta suscetibilidades diferentes a doenças, e a base para essa suscetibilidade diferencial pode ter uma componente genética e/ou ambiental (Kinane & Hart, 2003). De facto, a maioria das doenças humanas apresenta uma componente genética na sua etiologia. No entanto, a forma e a extensão dessa contribuição pode variar muito, de acordo com a doença em causa (Kinane & Hart, 2003; Li et al., 2016).

Uma variante alélica pode ter grandes implicações para as características de uma doença, que podem variar entre determinar a sua etiologia a apenas ter um efeito menor nessa mesma doença. Para avaliar o efeito de uma variante genética numa patologia, é necessário entender a forma como os genes contribuem para as doenças genéticas (Darby, 2022; Kinane & Hart, 2003; Pihlstrom et al., 2005). No caso da periodontite, estes desempenham, claramente, um papel significativo na sua predisposição e progressão e espera-se que, no futuro, a identificação destes genes específicos possa ter um valor diagnóstico e terapêutico (Chou et al., 2011; Heikkinen et al., 2016; Kinane et al., 2005; Weng et al., 2016).

O risco de desenvolver uma determinada doença, no caso concreto a periodontite, não é igual para todos os indivíduos de uma população, uma vez que há uma variedade de fatores – microbianos, ambientais, comportamentais e sistémicos – que influenciam o risco de se chegar a desenvolver a patologia (Kinane & Hart, 2003; Kinane et al., 2005; Solomon et al., 2017; Tonetti et al., 2018). As diferenças na resposta do hospedeiro entre indivíduos não se limitam apenas à resposta imune, mas também se podem manifestar através de diferenças na resposta inflamatória ou em aspetos básicos da imunidade inata. Assim, uma série de variações genéticas na resposta do hospedeiro pode aumentar a suscetibilidade à doença periodontal, caso a placa bacteriana se acumule na região do sulco gengival (Kinane & Hart, 2003; Kinane et al., 2005; Pihlstrom et al., 2005; Tsai et al., 2017).

Um número significativo de evidências clínicas e científicas comprovam que os fatores genéticos são importantes determinantes da suscetibilidade e progressão da periodontite. O suporte para esta afirmação tem por base estudos realizados em humanos e animais, que indicam que os fatores genéticos influenciam as respostas inflamatórias e imunes em geral, e, mais especificamente, a resposta à periodontite (Hernández et al., 2012; Kinane & Hart, 2003; Kinane et al., 2005; Solomon et al., 2017; Takashiba & Naruishi, 2006). Efetivamente, a doença periodontal é iniciada pelos microrganismos existentes na placa bacteriana que, por sua vez, se acumula na região do sulco gengival. Contudo, é a resposta do hospedeiro que vai determinar a progressão da gengivite para periodontite (Passoja et al., 2008; Chou et al., 2011; Karthikeyan et al., 2019; Tsai et al., 2017). Quer isto dizer que, apesar de serem os fatores microbianos e ambientais a iniciarem e modularem a doença periodontal, é a resposta individual, influenciada pelo perfil genético de cada indivíduo, que vai determinar a progressão da doença periodontal. A resposta do hospedeiro é determinada até certo ponto pela experiência anterior (imunidade adquirida), mas é predominantemente influenciada pela composição genética da pessoa (Kinane & Hart, 2003; Kinane et al., 2005; Weng et al., 2016).

4.2 Polimorfismos genéticos na periodontite

Considerando as diferenças de suscetibilidade existentes entre indivíduos, gerou-se, ao longo dos últimos anos, a hipótese de que o “*background*” genético de um indivíduo era capaz de influenciar o carácter progressivo e a gravidade do processo inflamatório associado à periodontite. Efetivamente, os polimorfismos genéticos têm a capacidade de influenciar a imunidade inata e adaptativa, podendo, assim, ser determinantes para o desfecho de uma determinada doença (Heikkinen et al., 2016; Kinane et al., 2005; Pihlstrom et al., 2005; Tsai et al., 2017). Diversos SNPs têm sido associados ao risco de progressão da periodontite, entre estes, destacam-se os localizados nas interleucinas, nos recetores de superfície como a família Fcy, na cicloxigenase 2 (COX-2) e em alguns membros da família das metaloproteinases de matriz, nomeadamente na MMP-8 e nos seus inibidores (TIMPs) (Jiang et al., 2014; Song & Lee, 2013; Stabholz et al., 2010; Weng et al., 2016).

Os polimorfismos genéticos das MMPs têm despertado a atenção de muitos investigadores, devido ao papel essencial que estas metaloproteinases desempenham na

remodelação e destruição do tecido periodontal (Heikkinen et al., 2016; Lee et al. 1995; Majumder et al., 2019). Atendendo ao papel crucial da MMP-8 ao nível dos tecidos periodontais, gerou-se, ainda, a hipótese de que os polimorfismos no gene da MMP-8 poderiam afetar a expressão ou atividade desta metaloproteinase e, consequentemente, influenciar não só a gravidade, mas também a predisposição para a periodontite (Alotaibi et al., 2020; Chou et al., 2011; Li et al., 2016; Passoja et al., 2008; Sorsa et al., 2016; Tsai et al., 2017; Weng et al., 2016). Esta hipótese é, atualmente, apoiada por diversos estudos que referem um aumento da frequência de SNPs em MMPs, em pacientes periodontais. Contudo, existem outros estudos que refutam esta associação, visto terem obtido resultados que demonstram pouca ou nenhuma associação entre SNPs em genes de MMPs e a etiopatogenia da periodontite (Emingil et al., 2014; Li et al., 2016; Majumder et al., 2019; Tsai et al., 2017).

O gene MMP-8, que codifica a proteína MMP-8, encontra-se localizado no braço longo (q) do cromossoma 11, na posição 22.2-22.3 (11q22.2-q22.3) e é atualmente um potencial e promissor candidato a marcador genético na periodontite, devido ao papel significativo que a MMP-8 desempenha na destruição patológica da matriz extracelular (Chou et al., 2011; Franco et al., 2017; Holla et al., 2012; Luchian et al., 2022; Murthykumar et al., 2019; Rai et al., 2008; Sorsa et al., 2016).

A localização específica dos polimorfismos do gene MMP-8 pode variar. Um polimorfismo no promotor pode afetar a ligação dos fatores de transcrição ao gene que, por sua vez, podem afetar a expressão do mesmo (Alotaibi et al., 2020; Emingil et al., 2014; Tsai et al., 2017). Como tal, foi possível identificar alguns polimorfismos de nucleótido único na região promotora deste gene, nas posições -799C/T (rs11225395) e -381A/G (rs1320632). Identificou-se, também, o polimorfismo +17C/G (rs2155052) que não se situa no promotor, uma vez que se localiza numa zona do gene após o início da transcrição do gene ((*transcription start site* (TSS)) (Chou et al., 2011; Holla et al., 2012; Murthykumar et al., 2019).

Recentemente, múltiplas investigações têm tido como objetivo demonstrar a associação das variações alélicas no gene da MMP-8, particularmente ao nível dos SNPs nas posições -799 C/T, -381 A/G, +17 C/G, com a periodontite. Todavia, apenas se verificou uma correlação significativa no polimorfismo MMP-8 -799 C/T (Emingil et al., 2014; Heikkinen et al., 2016; Li et al., 2016). O polimorfismo bialélico localizado na região -799 caracteriza-se pela substituição da base azotada citosina (C) por uma base azotada timina (T). A substituição de um nucleótido por outro diminui a afinidade da

ligação de um repressor transcricional, que resulta no aumento dos níveis de mRNA e da atividade da MMP-8. Verifica-se, ainda, que o alelo T provoca um aumento da transcrição, na ordem de 1.8 vezes, quando comparada com pacientes portadores do alelo C (Chou et al., 2011; Emingil et al., 2014; Lee et al., 1995; Segulier et al., 2001; Weng et al., 2016).

5. Técnicas laboratoriais para a análise dos polimorfismos

5.1 Técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

A técnica de PCR transformou, radicalmente, a ciência desde o momento em que foi descoberta por Mullis, em 1983 e, devido ao seu amplo uso, é importante entender os seus princípios básicos (Templeton, 1992; Valones et al., 2009). Esta técnica permite a amplificação de fragmentos específicos de DNA, através de uma amostra pequena de material genético, mesmo quando o DNA de origem tem uma qualidade relativamente baixa (Mullis, 1990).

A reação em cadeia de polimerase tornou-se, rapidamente, numa das técnicas mais utilizadas no ramo da biologia molecular, visto que imita o processo *in vivo* de replicação do DNA (Bermingham & Luetlich, 2003). Consiste, então, num método rápido e fácil de gerar um número ilimitado de cópias de qualquer fragmento de DNA, mesmo quando o material genético se encontra danificado, com um elevado nível de precisão (Joshi & Deshpande, 2011).

Cada ensaio de PCR requer a presença de DNA, *primers*, nucleótidos e DNA polimerase (uma enzima chave que une os nucleótidos individuais, para originar o produto PCR). A presença de cada um destes quatro componentes, com uma função específica, é fulcral para a realização da técnica de PCR. Posto isto, os nucleótidos, que incluem as quatro bases, agem como blocos de construção usados pela DNA polimerase para criar o produto de PCR. Os *primers*, que são pequenos fragmentos de DNA com uma sequência de nucleótidos complementar à sequência presente no DNA que se pretende amplificar, servem, então, como um ponto de extensão para a DNA polimerase iniciar a formação de cópias (Canene-Adams, 2013; Garibyan & Avashia, 2013).

É importante destacar o papel da DNA polimerase, dado a sua capacidade de permanecer ativa após a sua exposição repetida a 94°C, durante a etapa da desnaturação. Desta forma, o uso de polimerases de DNA termoestáveis permitiu a automatização da técnica de PCR, tornando-a altamente desejável (Bermingham & Luetlich, 2003).

Esta técnica compreende três etapas distintas: desnaturação, hibridação ou *annealing* e extensão. Como o nome indica, remete para uma reação em cadeia. Quer isto dizer que é constituída por numerosos ciclos, nos quais estas três fases são repetidas, na mesma ordem, para cada ciclo (Templeton, 1992).

Na primeira fase, ocorre a desnaturação do DNA. A solução de reação é aquecida a uma temperatura de 94°C, que é a temperatura acima do ponto de fusão das duas cadeias de nucleótidos complementares da molécula de DNA, que se pretende amplificar. Esta temperatura permite, então, que as moléculas de DNA se separem em duas cadeias individuais, provocando, assim, a sua desnaturação. Na segunda fase, a temperatura é reduzida para um intervalo entre os 37°C a 55°C, que permite que os *primers* específicos se liguem às cadeias de nucleótidos resultantes da desnaturação do DNA. Esta segunda etapa é a hibridação ou *annealing* e ocorre, apenas, nos locais com sequências complementares aos *primers*. Nesta fase, a temperatura mais baixa é utilizada para amplificações que não necessitam de uma alta especificidade ou rigor, enquanto a mais elevada é aplicada em situações que exigem maior especificidade ou rigor. Por último, na terceira fase, a temperatura é novamente elevada, desta vez a 72°C, para que a enzima DNA polimerase seja capaz de estender os *primers*. Este processo de extensão ocorre por meio de uma reação de molde, em que os nucleótidos complementares que vão formar a nova cadeia são ligados, covalentemente, por ação da DNA polimerase (Garibyan & Avashia, 2013; Joshi & Deshpande, 2011). Como resultado do PCR, ocorre um aumento exponencial no número total cópias do material genético, uma vez que este duplica a cada ciclo em que há repetição das três fases (Canene-Adams, 2013; Templeton, 1992).

A técnica de PCR detém várias vantagens, nomeadamente o facto de ser simples, altamente sensível e produzir resultados rapidamente (Joshi & Deshpande, 2011). Dispõe, ainda, do potencial para produzir milhões de cópias de um produto específico (Garibyan & Avashia, 2013). Na maioria das aplicações, é a sequência e a combinação dos *primers* que determinam o sucesso geral do ensaio (Bermingham & Luetlich, 2003).

No entanto, também apresenta algumas limitações. Uma vez que é altamente sensível, qualquer contaminação da amostra por vestígios de DNA poderá produzir resultados enganadores. Os *primers* também podem apresentar algumas limitações. Por

um lado, são necessários conhecimentos prévios para os projetar, pelo que esta técnica apenas pode ser aplicada na identificação da presença ou ausência de genes conhecidos (Bermingham & Luetlich, 2003). Por outro lado, os *primers* podem emparelhar não especificamente com sequências semelhantes, mas não completamente idênticas ao DNA alvo. Por fim, outra limitação inclui, ainda, a incorporação de nucleótidos incorretos na sequência de PCR pela DNA polimerase. Contudo, esta última limitação apresenta uma taxa de ocorrência baixa (Garibyan & Avashia, 2013).

O método mais utilizado para visualizar e analisar o produto de PCR é, efetivamente, a eletroforese em gel de agarose, que separa os produtos de DNA com base no seu tamanho e carga. Este método, muito simples, permite a confirmação da presença e determinação do tamanho do produto de PCR. Em cada análise eletroforética tem de se usar marcadores moleculares, ou seja, um conjunto de fragmentos de DNA, com tamanhos conhecidos, para a determinação do tamanho do produto (Garibyan & Avashia, 2013).

5.2 Técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

A técnica *Restriction Fragment Length Polymorphism* baseia-se na digestão de DNA, por meio de endonucleases de restrição, e é comumente utilizada para genotipagens de SNPs (Chuang et al., 2008; Southern, 1975).

Para efetuar uma análise PCR-RFLP é necessário cumprir algumas etapas. A primeira envolve a amplificação do fragmento de DNA, que contém a variação que se pretende estudar. Seguidamente, adiciona-se uma enzima de restrição a esta solução, cuja função é a hidrólise do fragmento amplificado (Rasmussen, 2012). As enzimas de restrição mais comumente utilizadas nesta técnica são as endonucleases de restrição do tipo II (Brettschneider, 1998). Estas reconhecem sequências de 4-6 pares de bases e hidrolisam o DNA numa sequência nucleotídica específica, designada de local de reconhecimento da endonuclease de restrição (Teama, 2018). Caso a enzima de restrição, apropriada para a variação que se pretende analisar, seja capaz de reconhecer o local, irá hidrolisar o fragmento no local de reconhecimento, produzindo fragmentos de restrição específicos, de tamanhos esperados. Recorrendo à técnica de eletroforese em gel, os fragmentos resultantes são, então, separados de acordo com o seu tamanho, o que permite que o fragmento que se pretende analisar seja distinguido dos restantes (Chuang et al.,

2008). O padrão de fragmentos produzidos é comparado com uma amostra de referência. Quaisquer diferenças nos padrões de fragmentos podem ser utilizadas para identificar variações genéticas, como SNPs, inserções, deleções, entre outros (Bermingham & Luetlich, 2003).

A análise PCR-RFLP apresenta as vantagens de ter um baixo custo associado e de não exigir equipamento complexo (Rasmussen, 2012). Todavia, as desvantagens incluem dificuldades na identificação da variação exata, caso vários SNPs afetem o mesmo local de reconhecimento de enzimas de restrição, e a necessidade de utilizar endonucleases específicas. Além disso, uma vez que envolve várias etapas, incluindo a separação por eletroforese, esta técnica é considerada relativamente demorada. Por último, destaca-se a limitação da utilização desta técnica em análises simultâneas de um elevado número de SNPs diferentes. Esta limitação prende-se com a necessidade de recorrer a um par de *primers* e enzimas de restrição específicos, para cada SNP (Brettschneider, 1998).

II. OBJETIVOS E HIPÓTESES DO ESTUDO

O presente estudo tem como objetivo avaliar, através da realização de um estudo piloto, a possível relação entre a presença do polimorfismo genético MMP-8^{-799 C>T} e o desenvolvimento de periodontite, numa população portuguesa de pacientes da Clínica Dentária Egas Moniz.

As hipóteses de estudo estabelecidas foram as seguintes:

- **Hipótese nula (H0):** Não se verifica uma associação entre o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ no promotor do gene MMP-8 e o desenvolvimento da periodontite;
- **Hipótese alternativa (H1):** Verifica-se uma associação entre o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ no promotor do gene MMP-8 e o desenvolvimento da periodontite.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Considerações éticas

O presente estudo de investigação, denominado “Associação do polimorfismo do promotor do gene da metaloproteinase 8 com a periodontite – estudo piloto” está integrado no projeto MMP89POLYACT, financiado pela EM/CiiEm Investiga, com o título “Relationship between metaloproteinases 8 and 9 promoter gene polymorphisms, protein activity and periodontitis susceptibility in a Portuguese population”.

A Comissão de Ética do Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM) aprovou o projeto por unanimidade, com o número de processo interno nº 922 (Anexo 1).

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia, revista pela última vez em outubro de 2013.

No decorrer da recolha de amostras, foi lido e assinado por todos os participantes um Termo de Consentimento Informado (Anexo 2), de forma a esclarecer os objetivos e a metodologia do estudo em causa. Todos os participantes que integraram o presente estudo tomaram conhecimento dos procedimentos envolvidos e do carácter voluntário da sua participação.

Foram tomadas medidas adequadas para a proteção dos dados dos pacientes, nomeadamente a atribuição de números a cada paciente, assim como a restrição da acessibilidade a estes dados, apenas por parte dos investigadores e responsáveis diretamente associados à investigação. Todas as informações obtidas foram mantidas em confidencialidade, incluindo o anonimato dos pacientes. As amostras foram descartadas no fim da investigação, após a sua análise laboratorial.

2. Caracterização do estudo

O presente estudo piloto trata-se de um estudo transversal controlado analítico. Esta investigação é considerada uma investigação primária do tipo fundamental, baseada numa metodologia mista e com um desenho de estudo experimental. A mesma consiste na análise de material genético recolhido em pacientes da Clínica Dentária Egas Moniz, para posterior análise e avaliação da possível relação entre a existência do polimorfismo genético MMP-8⁻⁷⁹⁹ com a periodontite, na população portuguesa.

3. Local de realização do estudo

A colheita do material genético decorreu no contexto das consultas de Periodontologia e de Triagem na Clínica Dentária Egas Moniz, localizada no IUEM. Por sua vez, a análise laboratorial deste material foi efetuada no Laboratório de Biologia Molecular do IUEM.

4. Seleção da amostra

Relativamente à amostra deste estudo, foram selecionados pacientes a partir da consulta de Periodontologia e Triagem, na Clínica Dentária Egas Moniz, para constituírem os dois grupos de estudo. Esta seleção ocorreu segundo a Nova Classificação de Doenças Periodontais, na qual a periodontite é diagnosticada clinicamente, quando existe uma perda de inserção em 2 ou mais pontos interproximais não adjacentes, ou perda de inserção de ≥ 3 mm em pelo menos 2 dentes (exceto os casos em que esta perda de inserção se deva a trauma, lesões cariosas, fratura radicular vertical, lesão endo-perio drenada através do periodonto marginal, bem como os casos em que esta perda se encontra localizada na face distal de um segundo molar devido ao mau posicionamento ou à extração de um terceiro molar). Desta forma, previamente à recolha das amostras, todos os candidatos foram submetidos a uma avaliação periodontal, através do preenchimento do Periodontograma. A partir dos dados obtidos, determinou-se o diagnóstico de cada participante do estudo.

A seleção dos pacientes foi, ainda, realizada segundo critérios de inclusão e exclusão, definidos previamente à recolha das amostras. Tendo por base estes critérios foi elaborado um questionário (Anexo 3), lido pelo operador e preenchido em conformidade com as respostas do paciente.

O primeiro grupo foi constituído por pacientes com saúde periodontal, que integraram o grupo controlo, enquanto o segundo grupo foi composto por pacientes diagnosticados com periodontite (grupo de teste).

É importante referir que todas as avaliações clínicas neste estudo foram realizadas pelo mesmo operador, de forma a não existirem variações na recolha das amostras.

Assim sendo, foram selecionados no total 45 pacientes (N=45), com idades compreendidas entre os 21 e 81 anos, em que 21 foram diagnosticados com periodontite

e 24 apresentavam saúde periodontal, constituindo o grupo de teste e o grupo de controlo, respetivamente. Nesta amostra 29 participantes são do género feminino e 16 do género masculino.

5. Critérios de inclusão

Para os critérios de inclusão selecionaram-se pacientes adultos, quer com saúde periodontal (que integraram o grupo controlo), quer diagnosticados com periodontite (que integraram o grupo de estudo), que aceitaram participar no estudo e assinaram o Consentimento Informado.

6. Critérios de exclusão

No que diz respeito aos critérios de exclusão, estes integram pacientes com perda ponderal, ou seja, pacientes com qualquer doença inflamatória crónica que não a periodontite, pacientes com cancro, pacientes em período de gestação ou em período de amamentação, pacientes com aparelho ortodôntico, pacientes que tenham sido submetidos a tratamento periodontal nos últimos seis meses e, ainda, pacientes com menos de 10 dentes remanescentes na cavidade oral.

Foi aplicado um questionário para seleção dos participantes, para aferir o cumprimento dos critérios definidos (Anexo 3).

7. Protocolo Clínico

Com o propósito de confirmar o cumprimento dos critérios de inclusão, o diário clínico de todos os candidatos foi consultado, antes de se iniciar o processo de recolha da amostra.

Após serem eleitos para fazerem parte deste estudo, os pacientes foram informados do objetivo do mesmo e da metodologia de natureza indolor, segura e rápida da recolha de amostras, através de um Consentimento Informado, que assinaram.

7.1 Colheita de material genético

Com recurso a um OmniSwab (Whatman FTA), um *swab* estéril de utilização única, foram recolhidas células da mucosa oral. O processo de recolha passou por esfregar firmemente a extremidade almofadada do OmniSwab, contra a mucosa jugal do paciente (Figura 2).



Figura 2. Colheita de material genético da mucosa jugal com recurso a um OmniSwab (Whatman FTA).

O facto desta extremidade ser removível por meio de um ejedor (Figura 3), não só facilitou a recolha, como também a extração de DNA, diretamente a partir da parte almofadada. Após a recolha das amostras, as mesmas foram colocadas dentro de tubos de “eppendorf” de 2 ml, previamente numerados, que foram colocados em gelo e, posteriormente, armazenados no frio, a uma temperatura de -20°C.

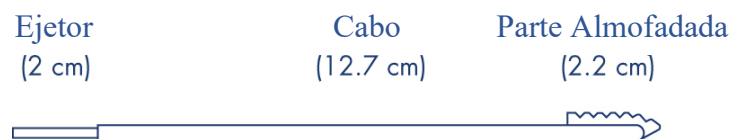


Figura 3. Representação esquemática de um OmniSwab (Whatman FTA).

Posteriormente, procedeu-se à extração de DNA das amostras e à análise genética, por meio da técnica de PCR – RFLP (*Polymerase Chain Reaction* seguida de *Restriction Fragment Length Polymorphism*), no laboratório de Biologia Molecular do IUEM. É importante referir que as amostras recolhidas foram única e exclusivamente utilizadas para este estudo piloto, tendo sido descartadas após a realização da análise laboratorial.

7.2 Extração de DNA

Procedeu-se à extração de DNA com base no “*Protocol: Isolation of Total DNA from Surface and Buccal Swabs*” retirado do *QIAamp DNA Investigator Handbook*. Primeiramente, realizou-se o processo de lise celular, que consistiu na adição de 20 µl de proteinase K (Figura 4) e 600 µl de *Buffer* ATL (Figura 5) a todos os tubos “eppendorf” com amostras, utilizando micropipetas devidamente calibradas. Posteriormente, cada tubo “eppendorf” foi colocado no vórtex por um período de 10 segundos, para homogeneizar as amostras (Figura 6).

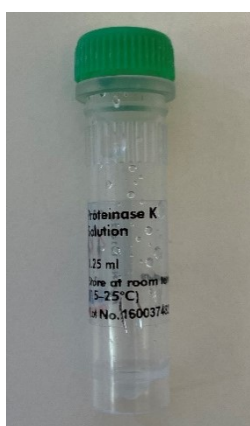


Figura 4. Proteinase K.

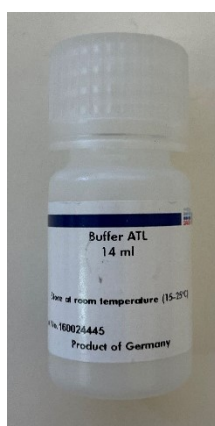


Figura 5. *Buffer* ATL.



Figura 6. Vórtex.

De seguida, as amostras foram colocadas num bloco incubador (Figura 7), a uma temperatura de 56°C por um período de 1 hora, e com agitação no vórtex, a cada 10 minutos, durante 10 segundos.

Para se removerem as gotas com material que ficaram nas paredes internas dos tubos “eppendorf”, as amostras foram, brevemente centrifugadas (Figura 8). Adicionaram-se 600 µl de *Buffer* AL (Figura 9) e as amostras foram, seguidamente, homogeneizadas no vórtex durante 15 segundos. É impreterível que a amostra e o tampão AL estejam completamente misturados, alcançando-se, assim, uma solução homogénea, assegurando, deste modo, a eficácia da lise.



Figura 7. Bloco incubador.



Figura 8. Centrifugadora.



Figura 9. Buffer AL.

A amostra foi de novo incubada a uma temperatura de 70°C durante 10 minutos. Durante a incubação, os tubos “eppendorf” foram agitados no vórtex a cada 3 minutos, por um período de 15 segundos, de forma a garantir a lise celular. Procedeu-se a uma breve centrifugação e adicionaram-se 300 µl de etanol (96-100%). As amostras foram, novamente, agitadas durante 15 segundos, seguindo-se uma nova centrifugação, para garantir a remoção do material que ficou aderente às paredes dos tubos “eppendorf”. É fundamental que a amostra e o etanol estejam completamente misturados, numa solução homogênea.

Tanto o *Buffer* ATL como o *Buffer* AL são tampões de lise. Por esta razão, a adição de ambos os tampões à amostra provocou a rutura da membrana celular. Como resultado, obtiveram-se extratos celulares contendo as moléculas de DNA de cada uma das amostras, em cada tubo “eppendorf”.

O passo seguinte, da extração do DNA, consistiu na transferência de 700 µl de cada uma das amostras para uma coluna QIAamp MinElute (inserida num tubo coletor de 2 ml) (Figuras 10 e 11). Esta etapa requereu especial atenção e precisão, de forma a não se tocar nem molhar a membrana de sílica. Procedeu-se à centrifugação a 8000 rpm durante 1 minuto e, cuidadosamente, descartou-se o material que não ficou retido na coluna, e voltou-se a inserir a coluna QIAamp MinElute no tubo coletor de 2 ml. Nas amostras com mais de 700 µl o processo foi repetido até ao ponto em que já não existia mais amostra.



Figuras 10 e 11. Coluna QIAamp MinElute inserida num tubo coletor de 2 ml.

De seguida, adicionaram-se 500 μ l de *Buffer* AW1 (Figura 12) sem tocar na membrana e procedeu-se à centrifugação durante 1 min, a 8000 rpm. Após a centrifugação, descartou-se, mais uma vez, o tubo coletor de 2 ml que continha o remanescente obtido durante esta etapa, e colocou-se a coluna QIAamp MinElute num novo tubo coletor de 2 ml. Este passo foi repetido, mas ao invés de se adicionar *Buffer* AW1, adicionaram-se 700 μ l de *Buffer* AW2 (Figura 13). Como ambos estes *Buffers* têm a função de tampões de lavagem, as etapas acima descritas permitiram a remoção dos produtos dos lisados que não ficaram retidos especificamente na coluna, ficando apenas as moléculas de DNA ligadas às colunas. É importante ter em atenção que algumas centrifugas podem vibrar durante a fase de desaceleração, fazendo com que o remanescente presente no fundo do tubo coletor entre em contacto com a coluna QIAamp MinElute. Por esta razão, a remoção da coluna QIAamp MinElute quer da centrifuga, quer do interior do tubo coletor, deve ser efetuada com cautela.

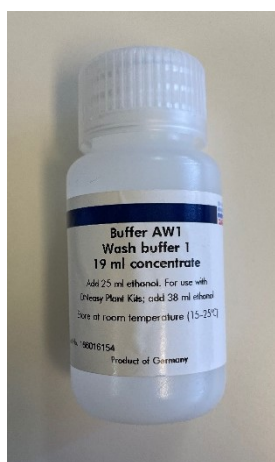


Figura 12. *Buffer* AW1.

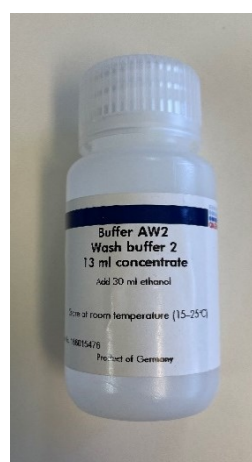


Figura 13. *Buffer* AW2.

A próxima etapa consistiu na adição de 700 µl de etanol (96-100%) e centrifugação durante 1 minuto, a 8000 rpm. O etanol foi adicionado para eliminar a água associada ao DNA, retido na coluna (Figura 14). Descartou-se, novamente, o tubo coletor com o remanescente, pelo que se colocou a coluna QIAamp MinElute num novo tubo coletor de 2 ml. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, durante 3 minutos, para secar a coluna por completo.

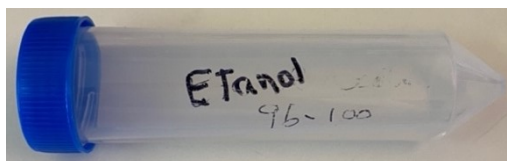


Figura 14. Etanol Absoluto (96-100%).

Procedeu-se à transferência da coluna QIAamp MinElute para um tubo de microcentrifugadora de 1.5 ml, e descartou-se o tubo coletor que continha a solução remanescente. A tampa da coluna QIAamp MinElute foi aberta com cuidado e incubou-se por 3 minutos, a uma temperatura de 56°C.

O último passo consistiu em adicionar, no total, 50 µl de *Buffer* ATE, à temperatura ambiente, no centro da membrana de cada uma das amostras, garantindo-se, assim, a eluição completa do DNA (Figura 15). Este procedimento foi dividido em duas fases, sendo que, em cada fase, se adicionaram 25 µl de *Buffer* ATE a cada coluna, e estas foram submetidas a uma incubação à temperatura ambiente (15-25°C), por 1 minuto. Após esta incubação, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, também, durante 1 minuto. A razão pela qual se dividiu esta etapa em duas fases, prende-se com o facto do processo de eluição com volumes menores aumentar, significativamente, a concentração final de DNA no eluato.

Após a conclusão do processo de extração de DNA, os tubos “eppendorf” foram, novamente, armazenados no frio (-20°C).



Figura 15. *Buffer ATE.*

7.3 Técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

O promotor do gene MMP-8 presente no DNA de cada amostra, foi amplificado por meio da técnica PCR. Esta técnica requer a utilização de iniciadores específicos para o gene MMP-8, pelo que as sequências de iniciadores diretos e reversos, correspondentes aos *primers forward* e *reverse*, respetivamente, foram descritas por Shen et al. (2017) (Tabela 3).

Tabela 3. Sequência dos *primers* seleccionados para o polimorfismo genético MMP-8⁻⁷⁹⁹. Adaptado de (Shen et al., 2017).

<i>Primers</i> MMP-8 ⁻⁷⁹⁹	Sequência
<i>Forward</i>	5'-CCATCTTCACATAGCCTTGG-3'
<i>Reverse</i>	5'-CCTTGTCTTCTGCCTGTGAA-3'

A técnica de PCR foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Shen et al. (2017). O DNA amplificado de cada amostra foi utilizado para a análise do polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ do tipo SNP, por meio da técnica de RFLP, seguida da análise eletroforética em gel de agarose, para avaliação dos fragmentos de DNA obtidos.

Iniciou-se o protocolo pela aliquotagem dos *primers*, numa concentração final de 10 µM (Figura 16). Seguidamente, efetuou-se o cálculo dos volumes finais que compõem a solução *Master Mix*, constituída por DNase/RNase-free H₂O, MyTaq (enzima Taq DNA

Polimerase, dNTP's e tampão contendo $MgCl_2$) (Figura 17), *primers forward* e *reverse*, multiplicando-se os valores de referência de cada constituinte, pelo número de amostras a analisar (Tabela 4). É importante salientar que o *Master Mix* foi preparado para um total de 48 amostras, sendo que 45 amostras eram DNA das amostras a analisar, uma era o controlo negativo (sem DNA) e o restante correspondia ao volume extra, caso ocorressem erros de pipetagem.

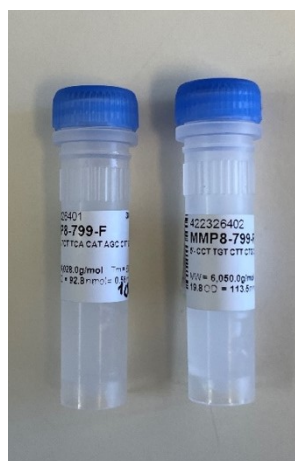


Figura 16. *Primers forward e reverse.*



Figura 17. MyTaq.

Tabela 4. Preparação das amostras para a técnica PCR.

	Soluções/Tampões	Valor de referência	VOLUME final (para 48 amostras)
MasterMix	MyTaq	12.5 µl	600 µl
	<i>Primer forward</i>	1 µl	48 µl
	<i>Primer reverse</i>	1 µl	48 µl
	DNase/RNase-free H ₂ O	5.5 µl	264 µl
DNA	-	5 µl	-
V_{final}	-	25 µl	-

Por conseguinte, a preparação do *Master Mix* envolveu um tubo “eppendorf”, ao qual foram adicionados 264 µl de DNase/RNase-free H₂O, 600 µl de MyTaq, 48 µl de *primer forward* e 48 µl de *primer reverse*.

De seguida, numeraram-se minitubos “eppendorf” de 0.5 ml, correspondentes ao número de amostras que iriam ser analisadas (Figura 18), e transferiu-se para o interior dos mesmos 20 µl do *Master Mix* previamente preparado. Posteriormente, adicionaram-se 5 µl de DNA de cada amostra ao minitubo “eppendorf” correspondente, exceto ao minitubo do controlo negativo, que ao invés de DNA possuía 5 µl de DNase/RNase-free H₂O adicionais, perfazendo, assim, o mesmo volume das restantes amostras com DNA. Desta forma, obteve-se um volume final de 25 µl em cada minitubo “eppendorf”.

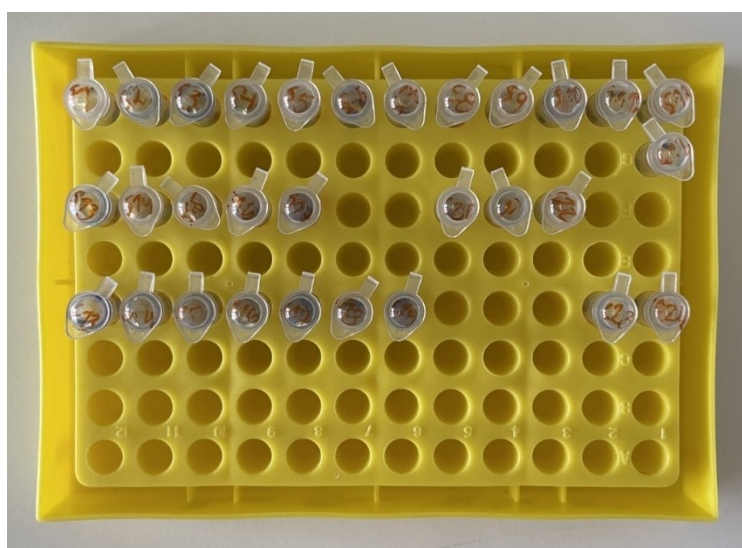


Figura 18. Suporte com minitubos “eppendorf” para análise PCR.

Por fim, para decorrerem as reações de amplificação, as amostras foram inseridas no termociclador *MJ MINI™ Personal Thermal Cycler* (Figuras 19 e 20). Segundo o protocolo descrito por Shen et al. (2017), para o polimorfismo do gene MMP-8 na posição -799, inicialmente foi programada uma primeira fase de 94°C durante 5 minutos, sucedida por 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 57°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos. Após os 35 ciclos estarem concluídos, terminou-se a amplificação com um período de 10 minutos a 72°C.



Figuras 19 e 20. Termociclador *MJ MINI™ Personal Thermal Cycler*.

7.4 Análise Eletroforética dos produtos amplificados do gene MMP8

Através da técnica de eletroforese em gel de agarose, analisaram-se os produtos amplificados do gene MMP-8 por PCR.

Para preparar o gel de agarose a 2% ou 3%, pesaram-se 4 ou 6 gramas de pó de agarose (SeaKem® LE Agarose) respetivamente, (Figura 21) num balão de Erlenmeyer e, de seguida, adicionaram-se 200 ml de TAE 1X (Tris Acetato EDTA) (Figura 22).

Esta mistura foi aquecida num micro-ondas, para solubilizar a agarose no tampão, obtendo-se uma mistura transparente e homogênea. Posteriormente, esperou-se que a mistura arrefecesse e adicionaram-se 10 µl de *RedSafe* (Figura 23). Este corante de DNA intercala-se nas ligações de hidrogénio entre as bases azotadas, permitindo visualizar bandas de DNA no gel de agarose, com recurso à luz ultravioleta.

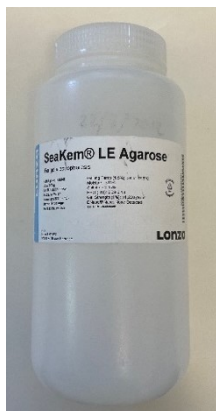


Figura 21. SeaKem® LE Agarose.



Figura 22. TAE 1X.



Figura 23. Corante *RedSafe*.

A solução, ainda morna e líquida, foi vertida para a “cama do gel”, colocando-se os pentes dentados, que serviram para produzir diversos poços (cavidades) no gel onde se colocaram as amostras (Figura 24). Após a solidificação do gel, retiraram-se os pentes e o gel foi transferido para uma tina horizontal de eletroforese com tampão TAE 1X, para que o gel ficasse totalmente submerso.

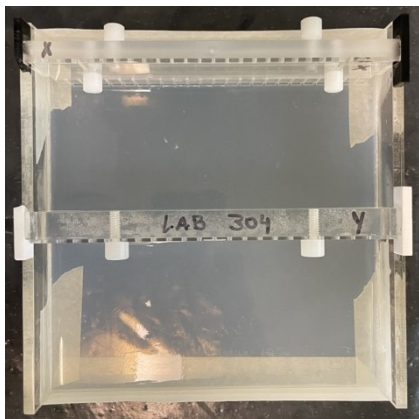


Figura 24. Cama de gel com pentes dentados.



Figura 25. Tampão com glicerol e azul de bromofenol a 0.05%.

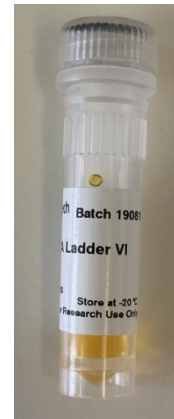


Figura 26. NZYDNA *Ladder* VI.

O passo seguinte correspondeu à preparação das amostras para a eletroforese. Para tal, adicionaram-se às amostras amplificadas de DNA 5 μ l de DNase/RNase-free H₂O e 5 μ l de um tampão com glicerol e azul de bromofenol a 0.05% (Figura 25). Este tampão foi adicionado para aumentar a densidade das amostras com as moléculas de DNA, além de também permitir controlar a migração das mesmas, devido à passagem de corrente elétrica. Desta forma, cada amostra colocada em cada poço continha 5 μ l do produto PCR, 5 μ l de DNase/RNase-free H₂O e 5 μ l de tampão azul de bromofenol a 0.05%, exceto o poço do controlo negativo, em que o volume correspondente ao produto de PCR foi substituído por DNase/RNase-free. Adicionaram-se, ainda, no primeiro e último poço, 7 μ l de NZYDNA *Ladder* VI (Figura 26), um marcador de massas moleculares, e a eletroforese decorreu com uma corrente elétrica de 100 mA (Figura 27). Por fim, com recurso a um transiluminador de luz ultravioleta, puderam-se observar as bandas de DNA e determinar a sua massa molecular (Figura 28).

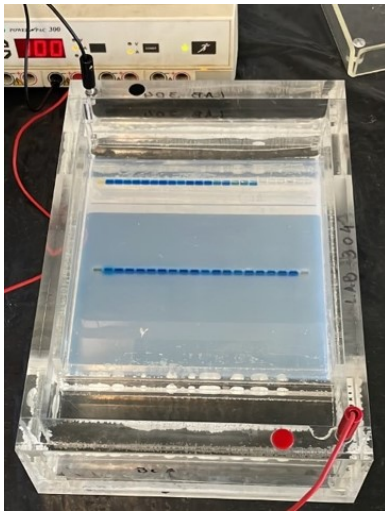


Figura 27. Tina horizontal de eletroforese.

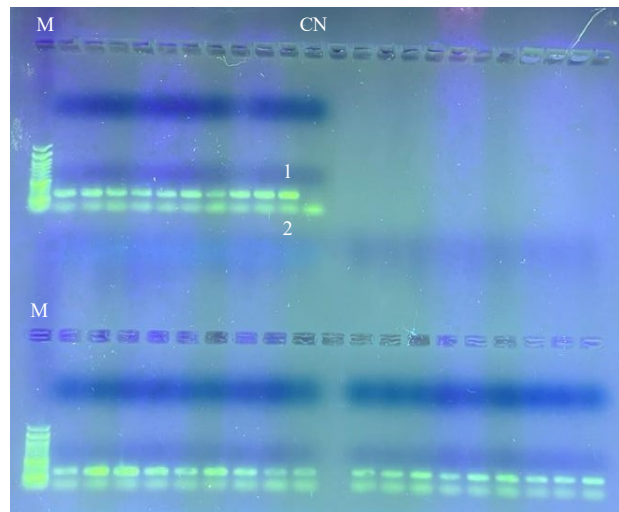


Figura 28. Gel de agarose a 2% exemplificativo do resultado do PCR de algumas amostras. M: marcador de massas moleculares (NZYDNA Ladder VI); CN: controle negativo; 1: banda resultante da amplificação do gene MMP-8 (285 pb); 2: banda resultante dos *primers forward* e *reverse* que não hibridaram com o DNA, na técnica de PCR.

7.5 Análise do polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ por *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

A técnica de RFLP foi realizada para se proceder à análise do polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹. Primeiramente, efetuaram-se os cálculos para calcular os volumes finais que iriam constituir a solução *Master Mix*, composta por DNase/RNase-free H₂O, enzima de restrição Sfc I (Figura 29) e o seu respetivo tampão NEBuffer 4 (Figura 30). Multiplicaram-se os valores de referência de cada constituinte pelo número de amostras (Tabela 5). Novamente, a preparação do *Master Mix* teve em conta um total de 48 amostras, visto 45 amostras serem referentes ao DNA do produto PCR e o restante correspondeu ao volume extra, no caso de ocorrerem erros de pipetagem.



Figura 29. Enzima de restrição Sfc I.



Figura 30. NEBuffer 4.

Tabela 5. Preparação das amostras para discriminação alélica, através da técnica de RFLP.

	Soluções	Valor de referência	Volume final (para 48 amostras)
<i>Master Mix</i>	Sfc I	1 µl/amostra	38 µl
	<i>Buffer</i>	3 µl	144 µl
	DNase/RNase-free H ₂ O	6 µl	298 µl
<i>V_{PCR}</i> (DNA)	-	20 µl	-
<i>V_{final}</i>	-	30 µl	-

Assim sendo, preparou-se o *Master Mix* num tubo “eppendorf” de 1.5 ml, ao qual foram adicionados 298 µl de DNase/RNase-free H₂O, 144 µl de *Buffer* e 38 µl de enzima de restrição Sfc I. Relativamente à endonuclease de restrição, apenas foram adicionados 38 µl e não 48 µl, uma vez que se realizou um *Master Mix*. No entanto, a redução de 10 µl da enzima Sfc I foi “compensada” com 10 µl adicionais de DNase/RNase-free H₂O, de forma a não existirem diferenças no volume final.

Retiraram-se 10 µl deste *Master Mix* para cada novo tubo “eppendorf” de 0.5 ml, previamente numerados (Figura 31). Posteriormente, em cada novo tubo “eppendorf” foram adicionados 20 µl da solução resultante da análise PCR, correspondente a cada amostra, exceto ao tubo “eppendorf” do controlo negativo. Desta forma, obteve-se um volume final de 30 µl em cada tubo “eppendorf” numerado. No final, as amostras permaneceram *overnight* a 37°C, para permitir a hidrólise do DNA, pela enzima de restrição Sfc I (Figura 32) (Tabelas 6 e 7).



Figura 31. Suporte com tubos “ependorf” para análise RFLP.



Figura 32. Estufa.

Após a incubação, prosseguiu-se para a técnica de eletroforese em gel de agarose a 3%, como previamente descrito. Este passo permitiu separar os fragmentos de DNA e analisar o seu tamanho.

Tabela 6. Endonuclease de restrição, temperatura e fragmentos esperados. Adaptado de (Shen et al., 2017).

Gene	Enzima de restrição	Temperatura (°C)	Fragmentos
MMP-8⁻⁷⁹⁹	Sfc I	37°C	172 + 113 pb (alelo C) 285 pb (alelo T)

Tabela 7. Perfil de restrição da endonuclease. Adaptado de (Shen et al., 2017).

Endonuclease de restrição	Perfil de restrição
Sfc I	5'... C▼TRYAG ... 3'
	3'... GAYRT▲C ... 5'
	Y = C ou T
	R = A ou G

8. Análise Estatística

A análise estatística foi executada com o *software R Statistical 4.0 (R package based on χ^2 test, Statistical Computing and Graphics, Inc.)*, através do pacote Hardy-Weinberg (H-W), que se baseia no teste estatístico de independência do Qui-quadrado (χ^2) de *Pearson*, com um intervalo de confiança (CI) de 95%. Foi efetuada uma análise estatística descritiva e indifferencial, para o tratamento e análise dos dados. A análise indifferencial foi realizada com o objetivo de comparar e testar a possível correlação entre as variáveis qualitativas estudadas, na presente investigação. Assim sendo, os dados obtidos foram comparados com os valores considerados expectáveis, segundo o equilíbrio de H-W. O equilíbrio de H-W determina que a variação genética para uma determinada população manter-se-á constante de geração para geração, apenas quando estão presentes a segregação mendeliana e a recombinação de alelos, assim como a ausência de fatores evolutivos. Isto é, a proporção de alelos dominantes e recessivos permanece constante e é determinada pela seguinte equação:

$$p^2 + 2(p \cdot q) + q^2 = 1$$

onde p é a frequência do alelo dominante e q é a frequência do alelo recessivo.

Desta forma, é possível avaliar se uma determinada população está a evoluir, já que uma discrepância na frequência de alelos poderá indicar que esta sofreu uma mudança evolutiva.

Para se rejeitar ou aceitar a hipótese nula, foi estabelecido um valor de significância de 5% ($p \leq 0.05$). Para valores de $p \leq 0.05$, existe uma diferença estatisticamente significativa entre os dados recolhidos e os expectáveis, pelo que estes valores foram considerados significativos para a distribuição alélica e genotípica, na amostra do presente estudo piloto.

IV. RESULTADOS

1. Análise das técnicas de PCR e PCR-RFLP

O polimorfismo do gene MMP-8 na posição -799 foi estudado utilizando a técnica de PCR-RFLP. Após a realização da técnica de PCR, procedeu-se à análise dos produtos de PCR, por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose, para se confirmar a presença de DNA amplificado. Posteriormente, efetuou-se a técnica de RFLP em que as amostras foram hidrolisadas pela enzima Sfc I, seguida de eletroforese em gel de agarose a 3%. A visualização de várias bandas, correspondentes aos fragmentos de DNA obtidos, permitiu identificar os diferentes genótipos para este polimorfismo, em cada uma das amostras. Para confirmar os genótipos, a massa molecular das bandas foi determinada utilizando o marcador de massas moleculares NZYDNA *Ladder* VI (Figura 33).

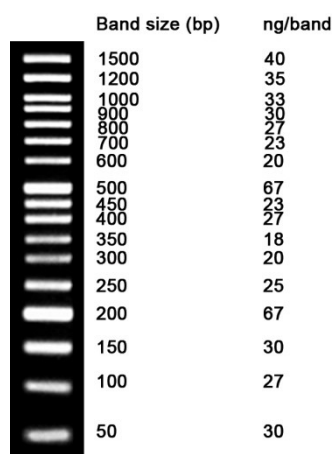


Figura 33. Bandas do marcador de massas moleculares NZYDNA *Ladder* VI.

Como previamente mencionado, o SNP estudado nesta investigação caracteriza-se pela substituição de uma base citosina (C), por uma base timina (T), o que origina dois possíveis alelos: alelo C e alelo T. As bandas correspondentes ao alelo C (alelo sem alteração) indicavam pacientes portadores do genótipo CC, enquanto bandas indicativas do alelo T (alelo mutado) constituíam indivíduos com um genótipo TT. No entanto, se neste gel fosse possível encontrar bandas correspondentes a ambos os alelos, estes indivíduos seriam portadores de um genótipo CT.

Por conseguinte, dos 45 pacientes que constituíam a amostra total deste estudo piloto (N=45), verificou-se que 14 indivíduos eram homozigóticos para o alelo C, associado às bandas de 172 pb + 113 pb, sendo, por isso, portadores do genótipo CC. Por outro lado, 9 pacientes eram homozigóticos para o alelo T, correspondente à banda de 285 pb, logo, portadores do genótipo TT. Todavia, verificou-se que os restantes 22 pacientes constituintes da amostra evidenciaram um genótipo CT, pelo que eram portadores de ambos os alelos C e T, correspondentes às bandas 285, 172 e 113 pb (Figuras 34, 35, 36 e 37).

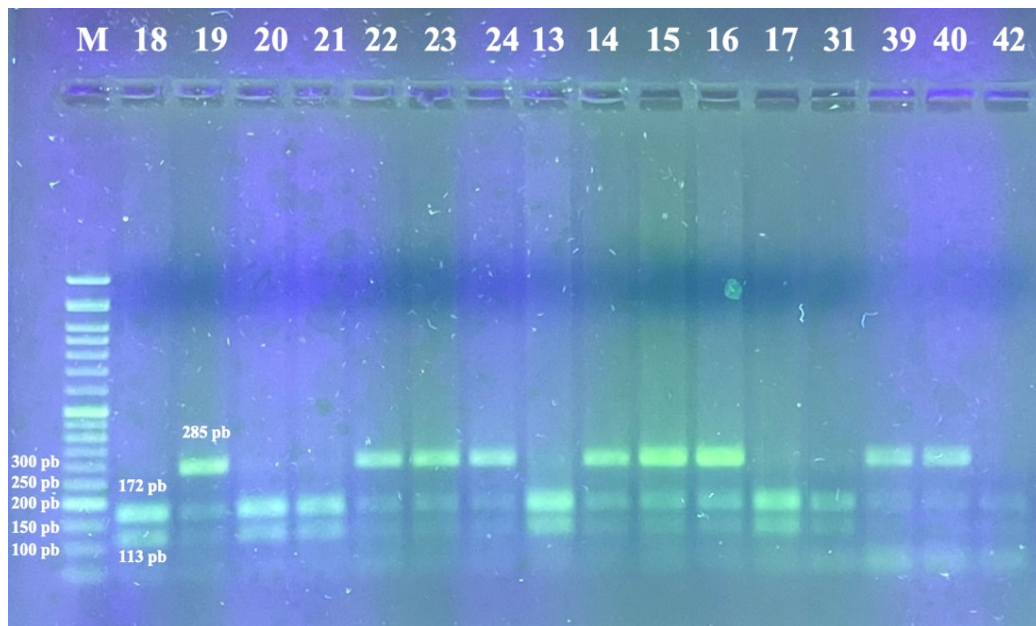


Figura 34. Gel de agarose a 3% exemplificativo de algumas amostras. M: marcador de massas moleculares (NZYDNA Ladder VI); Grupo controlo: nº 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24; Grupo doença: amostras nº 31, 39, 40, 42. As amostras 13, 17, 18, 20, 21, 31 e 42 eram homozigóticas para o alelo C, visto observarem-se as bandas correspondentes ao alelo C (172 + 113 pb). Em contrapartida, os indivíduos 14, 15, 16, 19, 22, 23, 24, 39 e 40 eram heterozigóticos, uma vez que foi possível observarem-se as 3 bandas distintas correspondentes ao alelo C e T (285, 172 e 113 pb).

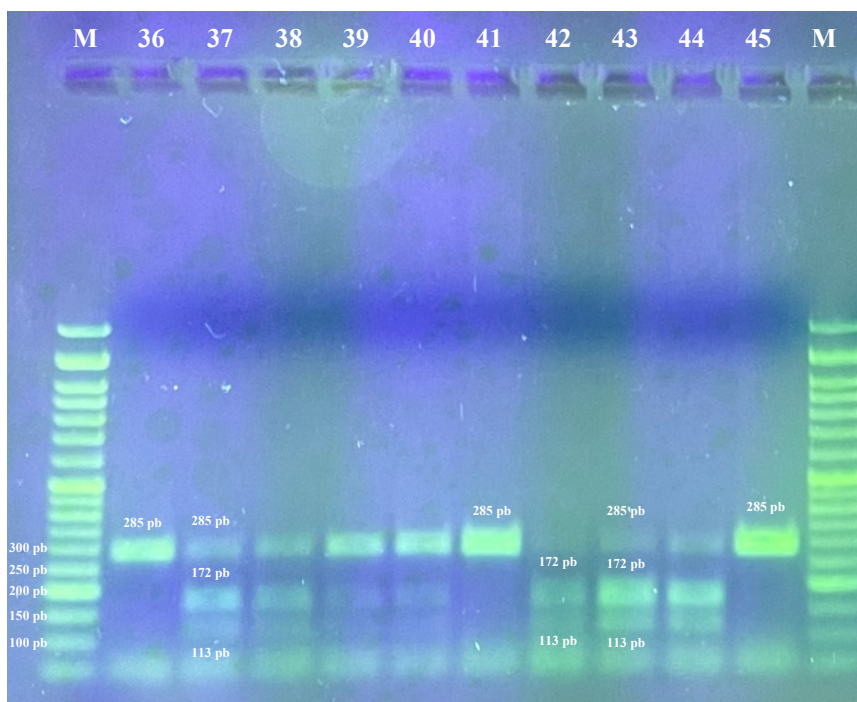


Figura 35. Gel de agarose a 3% exemplificativo de algumas amostras do grupo doença. M: marcador de massas moleculares (NZYDNA Ladder VI); Grupo doença: pacientes nº 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45. Os pacientes 36, 41 e 45, nos quais foi possível observar o fragmento 285 pb, eram homozigóticos para o alelo T, apresentando, assim, o genótipo TT. Para os indivíduos heterozigóticos, ou seja, os pacientes correspondentes aos números 37, 38, 39, 40, 43 e 44, observaram-se as 3 bandas correspondentes aos alelos C e T. Desta forma, nestes indivíduos foi possível verificar a presença dos fragmentos 285, 172 + 113 pb. No entanto, no paciente 42 apenas foi possível visualizar-se os fragmentos 172 + 113 pb, correspondentes ao alelo C, pelo que este paciente foi considerado homozigótico para o alelo C, sendo portador do genótipo CC.

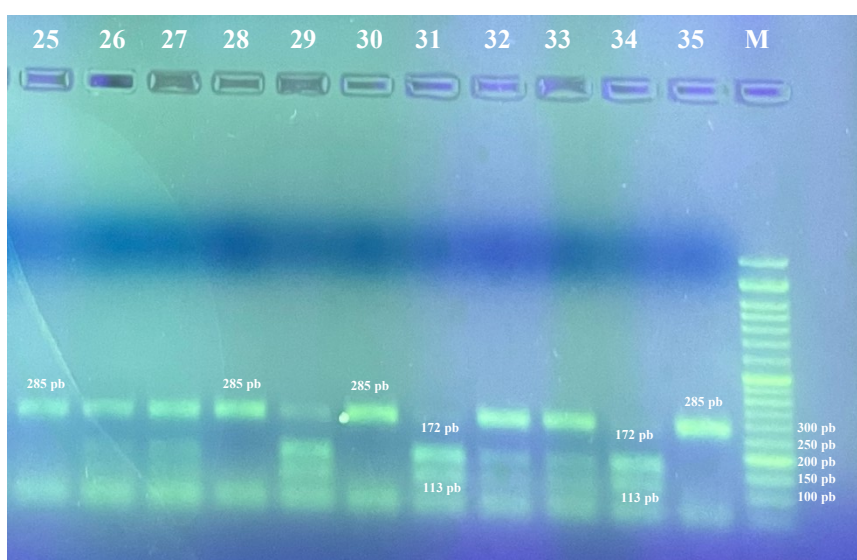


Figura 36. Gel de agarose a 3% exemplificativo de algumas amostras do grupo doença. M: marcador de massas moleculares (NZYDNA Ladder VI); Grupo doença: pacientes nº 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35. Os pacientes 25, 28, 30 e 35 eram homozigóticos para o alelo T (285 pb), enquanto os pacientes 31 e 34 eram homozigóticos para o alelo C (172 + 113 pb). Todavia, nos pacientes 26, 27, 29, 32 e 33 verificou-se a presença de ambos os alelos, pelo que eram heterozigóticos (285, 172 + 113 pb).

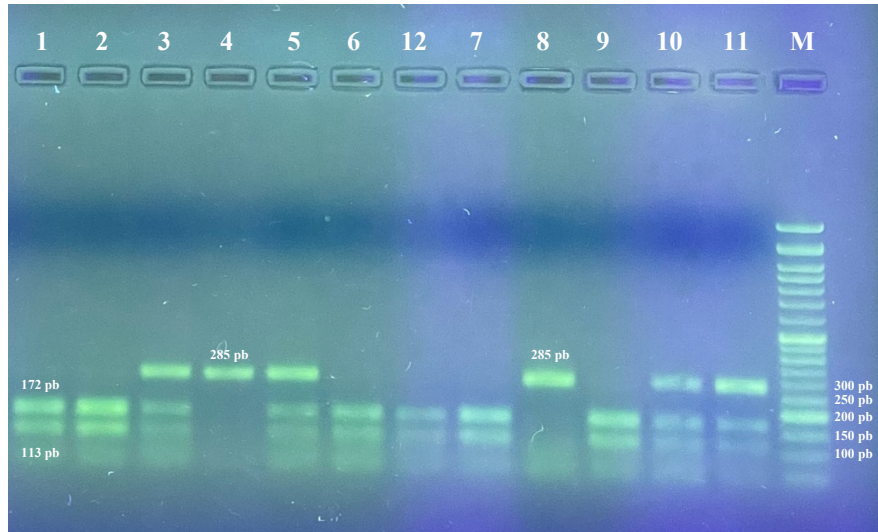


Figura 37. Gel de agarose a 3% exemplificativo de algumas amostras do grupo controle. M: marcador de massas moleculares (NZYDNA Ladder VI); Grupo controle: nº 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Relativamente ao grupo controle, apenas se observou uma banda correspondente ao alelo T (285 pb) nos indivíduos 4 e 8, sendo estes homozigóticos para o alelo T. Nos indivíduos 1, 2, 6, 7, 9 e 12 verificou-se a presença das bandas correspondentes ao alelo C (172 + 113 pb), pelo que eram homozigóticos para o alelo C. Já no caso dos indivíduos 3, 5, 10 e 11 observou-se a presença das 3 bandas correspondentes a ambos os alelos (285, 172 + 113 pb), pelo que apresentavam um genótipo heterozigótico.

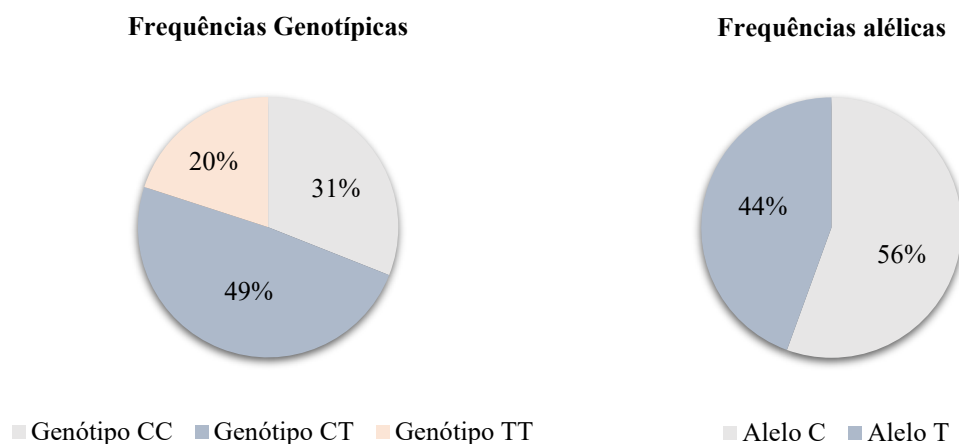
Considerando a totalidade da amostra (N=45), assim como os dados presentes no gel de agarose, é possível verificar-se a frequência dos genótipos CC, CT e TT. Por conseguinte, é possível avaliar as frequências alélicas dos alelos C e T (Tabela 8).

Tabela 8. Frequência de genótipos e alelos para o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹. N: tamanho da amostra.

Gene/SNP ID	N	Genótipo/Alelos	n	Freq.(%)	95% CI	Valor-p
MMP-8 (-799)	45	CC	14	31.11	(18.63, 46.8)	0.946
		CT	22	48.89	(33.94, 64.02)	
		TT	9	20,00	(10.09, 35.05)	
		C	50	55.56	(4.73, 65.9)	
		T	40	44.44	(34.1, 55.27)	

A partir da análise desta tabela, verifica-se que o genótipo CT tem a maior prevalência (48.89%), seguido do genótipo CC (31.11%) e do genótipo TT (20%). Assim

sendo, existe uma maior prevalência do alelo C em relação ao alelo T, com as percentagens de 55.56% e 44.44%, respetivamente, tal com ilustrado nas Figuras 38 e 39.



Figuras 38 e 39. Prevalência dos genótipos e alelos para o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹.

Ainda assim, analisando o valor de p da Tabela 6, é possível afirmar que a proporção de genótipos e, conseqüentemente, de alelos, está em equilíbrio de H-W, visto que o valor de $p = 0.946$ ($p > 0.05$). Esta análise é importante para considerar que o espectro amostral é adequado, para o estudo em questão.

2. Características demográficas

Seguidamente, procurando mitigar a influência de fatores demográficos na investigação, analisou-se a frequência de genótipos para a população masculina e feminina, representada na Tabela 9.

Tabela 9. Frequências genotípicas por género, para o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹. N: tamanho da amostra.

Gene/SNP ID	N	Genótipo	Masculino	(%)	Feminino	(%)	Valor- p
MMP-8 (-799)	45	CC	4	8.89	10	22.22	0.77
		CT	9	20	13	28.89	
		TT	3	6.67	6	13.33	

Os resultados observados para o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ foram comparados com os resultados que seriam esperados para uma população em equilíbrio de H-W (valor de $p > 0.05$). Assim, valores de $p < 0.05$ seriam considerados significativos para a distribuição genotípica e alélica desta amostra, com um intervalo de confiança de 95%, para se realizar o teste estatístico χ^2 da associação entre a frequência de genótipos e a população deste estudo.

De acordo com os dados da tabela 7, a distribuição das frequências genotípicas relativamente à amostra total (N=45), é de 8.89% para indivíduos do género masculino com o genótipo CC, 20% para indivíduos do género masculino com genótipo CT, 6.67% para indivíduos do género masculino com o genótipo TT, 22.22% para indivíduos do género feminino com o genótipo CC, 28.89% para indivíduos do género feminino com o genótipo CT e 13.33% para indivíduos do género feminino com o genótipo TT. Para que a interpretação desta informação seja mais objetiva, as frequências genotípicas foram organizadas em percentagens por género: dos 16 indivíduos do género masculino, 4 apresentaram o genótipo CC (25%), 9 o genótipo CT (56%) e 3 o genótipo TT (19%). Adicionalmente, dos 29 indivíduos do género feminino, 10 apresentaram o genótipo CC (34%), 13 o genótipo CT (45%) e 6 o genótipo TT (21%). A distribuição destas percentagens está representada na Figura 40.

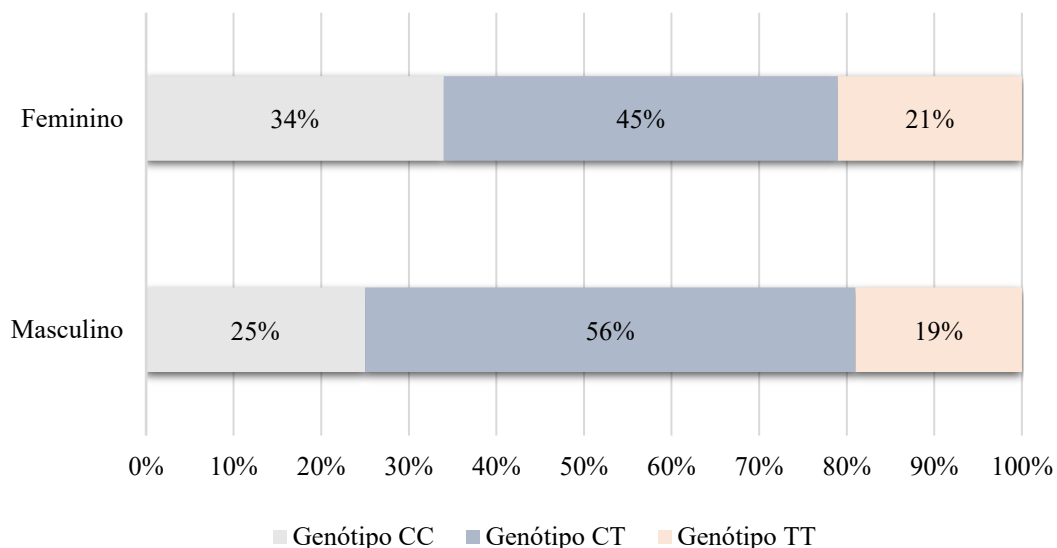


Figura 40. Prevalência das frequências genotípicas em função do género, para o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹.

Através da observação da Figura 40, é possível afirmar que a distribuição genotípica é transversal à variável gênero, já que esta é bastante semelhante para indivíduos do gênero masculino e do gênero feminino. Esta análise, aliada ao equilíbrio de H-W assente no valor de $p > 0.05$ da Tabela 7, permite revogar qualquer teoria de que a distribuição genotípica desta amostra é influenciada pelo gênero de um determinado indivíduo.

Procedeu-se, também, à análise da distribuição das frequências alélicas, de acordo com o gênero dos indivíduos deste estudo. Os resultados encontram-se representados na Tabela 10.

Tabela 10. Frequências alélicas por gênero, para o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹.

Gene/SNP ID	Alelo	Masculino	(%)	Feminino	(%)	Valor- <i>p</i>
MMP-8 (-799)	C	17	18.89	33	36.67	0.90
	T	15	16.67	25	27.78	

Verifica-se que, para a amostra alélica total (N=90), os alelos C em indivíduos do gênero masculino têm uma predominância de 18.89%, os alelos T em indivíduos do gênero masculino têm apenas 16.67%, os alelos C em indivíduos do gênero feminino têm uma prevalência de 36.67%, ao passo que os alelos T em indivíduos do gênero feminino têm uma prevalência de 27.78%.

Para uma análise mais objetiva, as frequências alélicas foram organizadas em percentagens por gênero: dos 32 alelos provenientes de indivíduos do gênero masculino, 17 correspondiam a alelos C (53%) e 15 a alelos T (47%); dos 59 alelos provenientes de indivíduos do gênero feminino, 33 correspondiam a alelos C (57%) e 25 a alelos T (43%). A distribuição destas percentagens está representada na Figura 41.

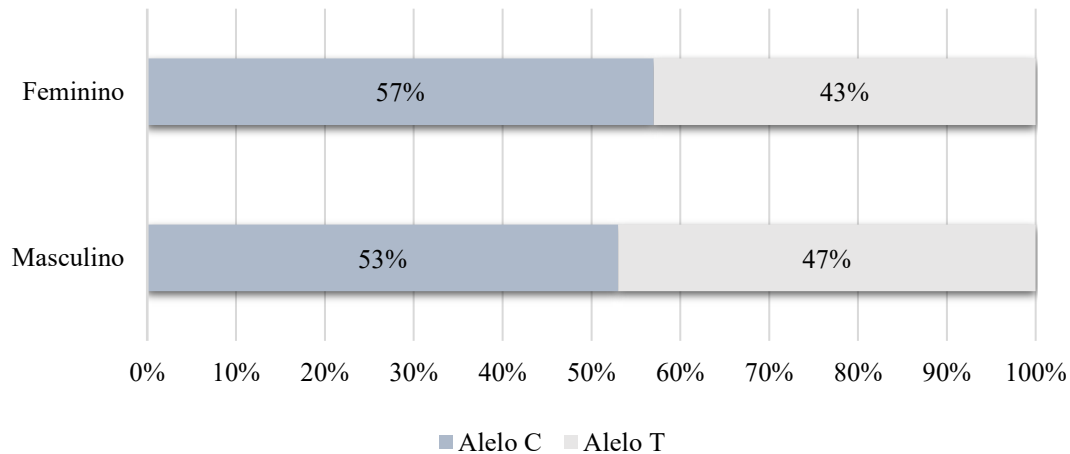


Figura 41. Prevalência das frequências alélicas em função do gênero, para o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹.

A distribuição alélica é bastante semelhante para os dois gêneros, e de forma similar às frequências genotípicas, o equilíbrio de H-W é assegurado pelo facto de, na Tabela 8, o valor de p ser igual a 0.90 ($p > 0.05$).

Em suma, os dados supracitados permitiram desassociar a influência da variável gênero na manifestação deste polimorfismo. Conclui-se, então, que a variável gênero não pode ser considerada como uma variável de confusão, uma vez que não existem diferenças estatisticamente significativas, nas amostras recolhidas.

Posto isto, foi investigada a correlação entre o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ e a ocorrência de periodontite.

3. Frequências genotípicas

As frequências genotípicas calculadas para o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹, relativamente ao grupo controlo e ao grupo doença, encontram-se representadas na Tabela 11.

Tabela 11. Frequências genotípicas nos grupos controle e doença para o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹. N: tamanho da amostra.

Gene/SNP ID	N	Genótipo	Saúde Periodontal (n=24)	(%)	Periodontite (n=21)	(%)	Valor-p
MMP-8 (-799)	45	CC	11	24.44	3	6.67	0.028
		CT	11	24.44	11	24.44	
		TT	2	4.44	7	15.56	

Considerando a amostra total (N=45), verificou-se que 11 indivíduos com o genótipo CC pertenciam ao grupo controle (24.44%), tal como 11 indivíduos com o genótipo CT (24.44) e apenas 2 indivíduos com o genótipo TT (4.44%). Por outro lado, no grupo doença constavam apenas 3 indivíduos com o genótipo CC (6.67%), 11 com o genótipo CT (24.44%) e 7 com o genótipo TT (15.56%).

Para uma interpretação mais objetiva desta informação, os dados foram organizados em função dos grupos controle e doença, e estão representados na Figura 42.

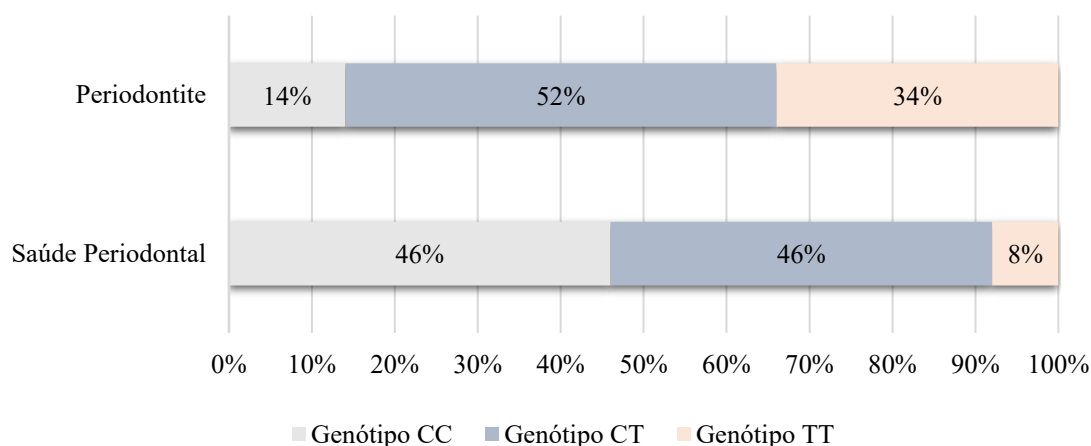


Figura 42. Prevalência dos genótipos CC, TT e CT no polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹, em ambos os grupos.

Como observado na Figura 42, considerando o número de indivíduos pertencentes ao grupo controle (n=24), verificou-se que 11 pacientes possuíam tanto o genótipo CC como o genótipo CT, ou seja, 46% para ambos os genótipos. Apenas 2 participantes exibiram o genótipo TT, representando 8% da amostra.

Por outro lado, os valores apresentados pelo grupo periodontite foram bastante diferentes. Apenas 3 indivíduos possuíam o genótipo CC (14%), 11 revelavam o genótipo CT (52%) e 7 apresentavam o genótipo TT (34%), tal como ilustrado na Figura 42.

Através da interpretação do valor de p resultante da Tabela 9, valor de $p = 0.028$ (< 0.05), e da análise dos dados ilustrados na Figura 42, confirma-se que existem evidências estatisticamente significativas, para afirmar que há uma correlação entre o genótipo de um indivíduo e a ocorrência de periodontite.

De facto, a análise da Tabela 9, conjuntamente com a Figura 42, permite retirar 3 conclusões muito pertinentes para a investigação: 1) relativamente aos indivíduos com o genótipo CC, a probabilidade de ocorrência de periodontite é quase 4x menor. Por conseguinte, conclui-se que o genótipo CC (sem alelos mutados) é, claramente, mais frequente em indivíduos saudáveis; 2) em relação aos indivíduos com o genótipo TT, existe uma probabilidade quase 4x maior de ocorrência de periodontite, do que de saúde periodontal. Desta forma, é possível inferir que o genótipo TT (com alelos mutados) é, evidentemente, mais frequente em indivíduos portadores de periodontite; 3) no que concerne aos restantes indivíduos heterozigóticos (genótipo CT), estes estão igualmente distribuídos pelos grupos controlo e doença.

4. Frequências alélicas

As frequências alélicas para o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ foram calculadas a partir da distribuição genotípica, apresentada na Tabela 9. De igual forma, foram considerados ambos os grupos de estudo (grupo controlo e grupo doença), assim como a totalidade da amostra (N=90). Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Frequências alélicas nos grupos controlo e doença para o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹. N: totalidade de alelos na amostra.

Gene/SNP ID	Alelo	Saúde Periodontal (n= 48)	(%)	Periodontite (n=42)	(%)	Valor- p
MMP-8 (-799)	C	33	36.67	17	18.89	0.013
	T	15	16.67	25	27.78	

Considerando os dados assinalados na Figura 39, verificou-se que cerca de metade dos indivíduos possuía alelos C (55.56%) enquanto a outra metade possuía alelos T (44.44%). É importante destacar o equilíbrio desta figura, para realçar as diferenças que vigoram nos dados da Tabela 10. Por um lado, existem 33 casos de alelos C associados a saúde periodontal, contra apenas 15 casos de alelos T. Por outro lado, existem apenas 17 casos de periodontite associados a alelos C, ao passo que 25 estão associados a alelos T. É de salientar que o valor de $p = 0.013$ na Tabela 10, pelo que é inferior a 0.05. Tal significa que existem evidências estatisticamente significativas para afirmar que há uma correlação entre as frequências alélicas e a ocorrência de periodontite. Assim sendo, estes dados foram organizados em percentagens por grupos doença e controlo, e estão ilustrados na Figura 43.

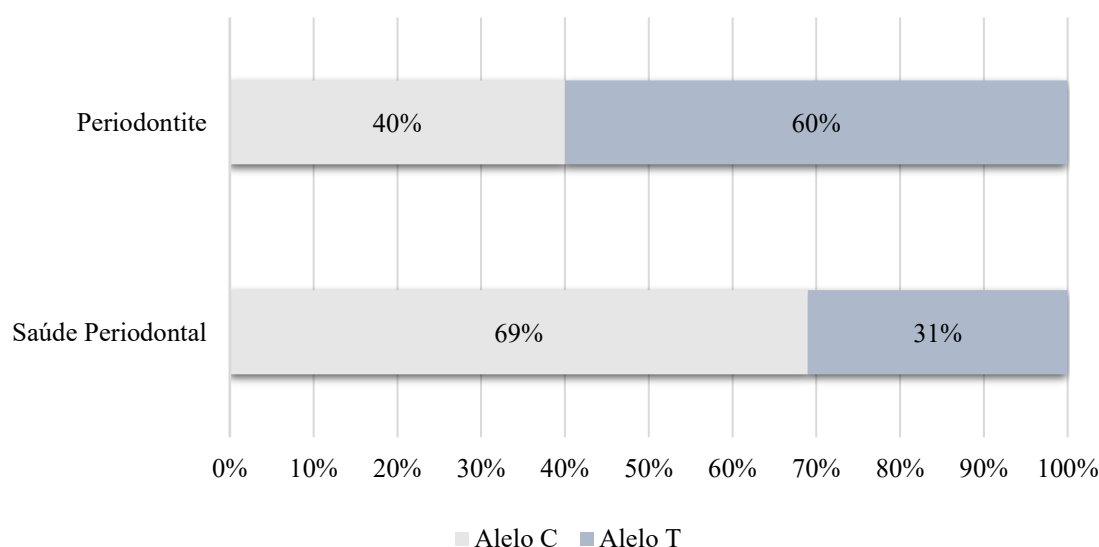


Figura 43. Prevalência dos alelos C e T no polimorfismo MMP-8-799, em ambos os grupos.

Verificou-se que, relativamente ao número de alelos provenientes do grupo doença ($n=42$), apenas 17 eram alelos C (40%), enquanto 25 eram alelos T (60%). Por outro lado, relativamente ao número de alelos provenientes do grupo com saúde periodontal ($n=48$), 33 eram alelos C (69%), ao passo que 15 eram alelos T (31%).

Em suma, e tal como assinalado na análise da distribuição das frequências genotípicas, é importante assinalar conclusões que se retiram da análise da Tabela 10 e da Figura 43. Por um lado, em relação aos indivíduos que apresentam periodontite, existe um acréscimo substancial de prevalência de alelos T. Por outro lado, no que toca a indivíduos que apresentam saúde periodontal, a prevalência de alelos C é bastante superior à de alelos T.

Estas conclusões, aliadas ao valor de p apresentado na Tabela 10, sustentam significativamente a teoria hipotetizada de que os alelos T (alelos mutados) estão associados à ocorrência de periodontite, confirmando a hipótese alternativa do estudo, que sustenta uma associação entre o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ e a periodontite.

V. DISCUSSÃO

A MMP-8 desempenha um papel crucial na regulação da inflamação e, por esta razão, é considerada como um importante mediador de doenças inflamatórias, como se verifica na periodontite (Fullmer et al., 1969; Lazarus et al., 1968). Desta forma, a ocorrência de um polimorfismo no gene MMP-8 que interfira na sua função e no nível de expressão do respetivo gene, pode influenciar o desenvolvimento da periodontite. Ao longo dos anos, vários estudos têm abordado o polimorfismo no gene MMP-8 na posição -799, com o intuito de compreender o seu papel no desenvolvimento da periodontite. No entanto, os resultados obtidos nestes estudos não são consensuais (Li et al., 2016; Tsai et al., 2017).

De acordo com alguns estudos, verificou-se um aumento da frequência deste SNP na MMP-8 em pacientes periodontais. Contudo, pelo contrário, outras investigações desmontaram existir pouca ou nenhuma associação entre este polimorfismo e a etiopatogenia da periodontite (Chou et al., 2011; Holla et al., 2012; Li et al., 2016). Apesar destes estudos se focarem na associação do polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ com a suscetibilidade e/ou gravidade da periodontite, existe um elevado nível de inconsistência nos estudos realizados, pelo que os resultados obtidos são inconclusivos (Alotaibi et al., 2020; Weng et al., 2016).

Chou et al. (2011) realizaram dois estudos sobre o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ numa população taiwanesa, com critérios de inclusão e exclusão similares aos do presente estudo piloto, em que a totalidade da amostra incluía 96 indivíduos com periodontite agressiva, 361 pacientes com periodontite crónica e 106 indivíduos saudáveis. Assim, cada estudo comparou cada uma das classificações de periodontite dos indivíduos do grupo doença (periodontite agressiva e periodontite crónica), com os indivíduos do grupo saúde. Todavia, perante a análise dos resultados, os autores não consideraram qualquer diferença entre os dois grupos com periodontite. Relativamente às características demográficas, verificou-se que a distribuição de indivíduos do género feminino e masculino não foi estatisticamente significativa para o estudo conduzido, tal como se constatou na presente investigação. As frequências genóticas observadas neste estudo para o grupo controlo foram de 50% para o genótipo CC, 37.7% para o genótipo CT e 12.3% para o genótipo TT. No caso do grupo periodontite agressiva, 35.4% apresentavam o genótipo CC, 52.1% o genótipo CT e 12.5% o genótipo TT. Relativamente ao grupo periodontite crónica, 33.8% tinham o genótipo CC, 52.9% o genótipo CT e 13.3% o

genótipo TT. Desta forma, o valor de p foi de 0.04, pelo que houve diferenças estatisticamente significativas. Esta variabilidade entre os diferentes grupos é estatisticamente significativa, no entanto, devido ao menor número de pacientes com o genótipo TT, neste estudo, os genótipos CT e TT foram agrupados como um grupo de portadores do alelo T, de forma a aumentar o poder estatístico desta análise. Assim sendo, relativamente ao grupo saúde, a percentagem de indivíduos portadores de apenas alelos C foi de 50%, enquanto os restantes indivíduos, portadores de alelos T, perfaziam os restantes 50%. Em relação ao grupo periodontite agressiva, os indivíduos portadores de apenas alelos C representavam somente 35.4% da amostra, ao passo que os indivíduos portadores de alelos T representavam a maior parte da amostra (64.6%). O mesmo sucedeu para o grupo de periodontite crónica, com os indivíduos portadores de apenas alelo C a representarem 33.8% da amostra, enquanto 66.2% eram indivíduos com alelos T. Foi calculado um novo valor de p para as percentagens com agrupamento de portadores do alelo T, ou seja, genótipos CT e TT. Este valor foi de $p = 0.009$, o que se traduz, mais uma vez, numa diferença estatisticamente significativa. Atendendo não só aos valores de p , como também às percentagens supramencionadas, os resultados deste estudo indicam que o alelo mutado, ou seja, o alelo T, está associado com a periodontite, em taiwaneses.

O estudo de Emingil et al. (2013), sobre o polimorfismo MMP-8⁷⁹⁹, efetuado numa população turca, em que 100 pacientes apresentavam periodontite agressiva e 167 indivíduos tinham saúde periodontal, abrangeu, no total, 267 indivíduos. Deste total, 119 eram do género masculino e 148 do género feminino. Os critérios de inclusão e exclusão foram, mais uma vez, semelhantes aos do presente estudo piloto. No que concerne ao grupo com periodontite agressiva, este era constituído por 43 indivíduos do género masculino e 57 do género feminino, e o grupo controlo era formado por 76 indivíduos do género masculino e 91 do feminino. Este estudo foi conduzido da mesma forma que a presente investigação, confirmando o equilíbrio de H-W e utilizando o teste estatístico χ^2 , em que a única diferença consistia no valor de p , que os autores consideraram $p < 0.005$. Os autores concluíram que, para o grupo doença, 11% dos indivíduos apresentavam o genótipo CC, 57% o genótipo CT e 32% o genótipo TT. Por outro lado, no caso dos indivíduos pertencentes ao grupo controlo, 45.5% detinham o genótipo CC, 39.5% o genótipo CT e 15% o genótipo TT. Neste caso, obtiveram um valor de $p < 0.001$, pelo que consideraram esta diferença estatisticamente significativa. Estes autores também analisaram a população de indivíduos portadores do alelo T (genótipos CT e TT), para aumentar o poder estatístico deste estudo. Assim, os portadores de alelo T no grupo

periodontite correspondiam a 89%, enquanto no grupo saúde perfaziam, apenas, 54.5%. Os autores calcularam, novamente, o valor de p , com base nestes valores, que continuou a ser inferior a 0.001. Relativamente às frequências alélicas, no grupo periodontite agressiva 39.5% dos indivíduos eram portadores apenas do alelo C, enquanto 60.5% eram portadores do alelo T. Já no grupo saúde periodontal, 65.3% detinham apenas o alelo C, ao passo que 34.7% detinham o alelo T. Assim, verificaram que tanto a distribuição dos genótipos, como dos alelos tinha sido significativamente diferente, entre os grupos de estudo, uma vez que $p < 0.001$. Desta forma, observaram que no grupo com periodontite havia uma maior prevalência do alelo T e, por conseguinte, concluíram que este alelo estava associado à periodontite, na população turca.

Os resultados obtidos no estudo de Holla et al. (2012) não vão de encontro aos estudos previamente mencionados, nos quais se verificou uma associação entre o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ e a periodontite. Neste estudo, efetuado numa população checa, com critérios de inclusão e exclusão idênticos aos do presente estudo piloto, em equilíbrio de H-W, não houve diferenças estatisticamente significativas entre indivíduos de diferentes géneros. Este estudo abrangeu 241 indivíduos com periodontite e 278 com saúde periodontal e, de facto, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas, quer nas frequências alélicas, quer nas frequências genotípicas. Relativamente às frequências genotípicas, constatou-se que no grupo controlo 30.2% dos indivíduos detinham o genótipo CC, 48.2% o genótipo CT e 21.6% o genótipo TT. No caso do grupo com periodontite, 25.8% tinham o genótipo CC, 47.8% com o genótipo CT e 26.4% com o genótipo TT. Em relação às frequências alélicas, 54.3% dos indivíduos do grupo saúde eram portadores do alelo C, enquanto os restantes 45.7% eram portadores do alelo T. Por outro lado, no caso dos pacientes periodontais, 49.7% tinham o alelo C, ao passo que 50.3% tinham o alelo T. Assim, no estudo conduzido por estes autores não se encontrou uma associação entre o SNP MMP-8⁻⁷⁹⁹ e a periodontite, visto os valores de p para as frequências alélicas e genotípicas terem sido de $p = 0.06$ e $p = 0.28$, respetivamente.

Majumder et al. (2019) realizaram um estudo caso-controlo para o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ numa população indiana, em que dos 357 participantes incluídos, 157 eram pacientes periodontais e os restantes 200 eram indivíduos saudáveis. Os critérios de inclusão e exclusão, assim como as estratégias aplicadas para a análise estatística, ou seja, o equilíbrio de H-W e o teste estatístico χ^2 , foram semelhantes aos aplicados no presente estudo-piloto. Todavia, contrariamente à presente investigação, verificou-se uma

diferença estatisticamente significativa quanto ao gênero dos indivíduos incluídos na amostra, com um valor de $p = 0.0016$. No estudo conduzido por estes autores, em relação ao grupo periodontite, observou-se que 27.4% dos indivíduos tinham o genótipo CC, 42% tinham o genótipo CT e 30.6% tinham o genótipo TT. Por outro lado, relativamente ao grupo controlo, a maioria apresentava o genótipo CT (55%), 35% com o genótipo CT e, apenas, 10% com o genótipo TT. No que concerne às frequências alélicas no grupo periodontite, 48% dos indivíduos apresentavam o alelo C e os restantes 52% apresentavam o alelo T. Relativamente ao grupo controlo, a grande maioria dos indivíduos (73%) tinham o alelo C e apenas 27% tinham o alelo T. Neste estudo verificaram-se diferenças estatisticamente significativas nas distribuições das frequências genotípicas e alélicas, uma vez que o valor de p foi < 0.0001 . Por conseguinte, os autores deste estudo puderam concluir que se verificou uma associação entre o alelo T e a periodontite.

Murthykumar et al. (2019) também realizaram um estudo do polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ numa população indiana com um total de 100 indivíduos, com uma distribuição equiparada entre ambos os grupos controlo e doença. Em relação ao grupo controlo, 30% apresentavam o genótipo CC, 46% o genótipo CT e 24% o genótipo TT. Por outro lado, no grupo doença, 32% tinham o genótipo CC, 44% o genótipo CT e 24% o genótipo TT. Na análise estatística obtida com recurso ao teste estatístico χ^2 , verificou-se que a frequência genotípica não apresentava valores estatisticamente significativos, já que os dados recolhidos estavam em equilíbrio de H-W, com o valor de $p = 0.97$. Posto isto, os resultados deste estudo indicam que não se verifica uma associação entre o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ e a periodontite.

Li et al. (2016) e Weng et al. (2016) realizaram revisões sistemáticas e meta-análises que, apesar de terem sido efetuadas independentemente uma da outra, avaliaram os estudos de Chou et al. (2011), Emingil et al. (2014) e Holla et al. (2012). Por esta razão, serão abordadas conjuntamente, visto terem chegado às mesmas conclusões. Relativamente à análise genotípica para o grupo periodontite e grupo saúde, no estudo de Chou et al. (2011), verificaram que o alelo T estava associado à periodontite, na população asiática. Do mesmo modo, no estudo de Emingil et al. (2104), observaram os mesmos resultados, numa população caucasiana. Contrariamente, os resultados de Holla et al. (2012) sugeriram que não existiam diferenças estatisticamente significativas, quer para as frequências alélicas, quer para as frequências genotípicas, numa população

caucasiana. Assim, estas duas revisões sistemáticas e meta-análises sugerem que não se verifica uma associação entre o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ e a periodontite.

Atualmente, para esta temática, ainda existem poucos estudos disponíveis na literatura. No que concerne à análise comparativa entre os estudos previamente mencionados, é importante destacar o facto de haver uma elevada heterogeneidade nas etnias das populações avaliadas. Esta heterogeneidade pode estar diretamente relacionada com a prevalência ou ausência deste polimorfismo genético, em diferentes populações. Assim, em diferentes populações, certamente verificar-se-ão resultados diferentes, em relação à associação deste SNP com a periodontite.

A heterogeneidade populacional, disponível na plataforma “*Ensembl Genome Browser*”, mostra estas variações observadas na distribuição das frequências alélicas e genotípicas, em diferentes populações (Figuras 44 e 45).

Assim, verificou-se que na população asiática, na qual se incluem os estudos de Chou et al. (2011), Majumder et al. (2019) e Murthykumar et al. (2019), 42.3% dos indivíduos são portadores do alelo T e os restantes 57.7% do alelo C. No caso das frequências genotípicas, 17.3% dos indivíduos apresenta o genótipo TT, 50% o genótipo CT e 32.7% o genótipo CC.

Por outro lado, relativamente à população europeia, que envolve os estudos de Emingil et al. (2013), Holla et al. (2012) e o presente estudo piloto, 41.1% dos indivíduos são portadores do alelo T, ao passo que 58.9% são portadores do alelo C. No que concerne às frequências genotípicas, 15.9% dos indivíduos contém o genótipo TT, 50.3% o genótipo CT e 33.8% o genótipo CC. Dando especial atenção à população ibérica, na qual se insere o presente estudo piloto, verifica-se que os valores são os seguintes: 36% dos indivíduos são portadores do alelo T, 65.2% são portadores do alelo C, 12.7% possui o genótipo TT, 44.2% o genótipo CT e 43.1% o genótipo CC. Comparando as percentagens da população europeia com a ibérica, verifica-se que não existem discrepâncias significativas.

No caso da população africana, 18.5% dos indivíduos são portadores do alelo T, ao passo que 81.5% são portadores do alelo C. Por outro lado, 32% dos indivíduos têm o genótipo TT, 30.7% o genótipo CT e 66.1% o genótipo CC.

Relativamente à população americana, 43.9% dos indivíduos são portadores do alelo T, enquanto 56.1% são portadores do alelo C. No que concerne às frequências genotípicas, 19.3% dos indivíduos apresenta o genótipo TT, 49.3% o genótipo CT e 31.4% o genótipo CC.

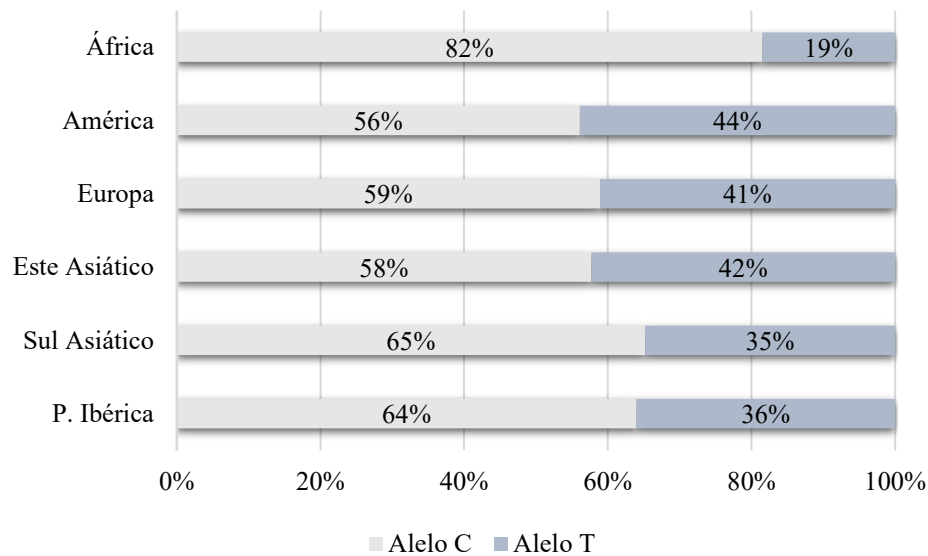


Figura 44. Distribuição alélica para o polimorfismo MMP-8-799, em diferentes populações. Adaptado de: <https://www.ensembl.org/index.html>

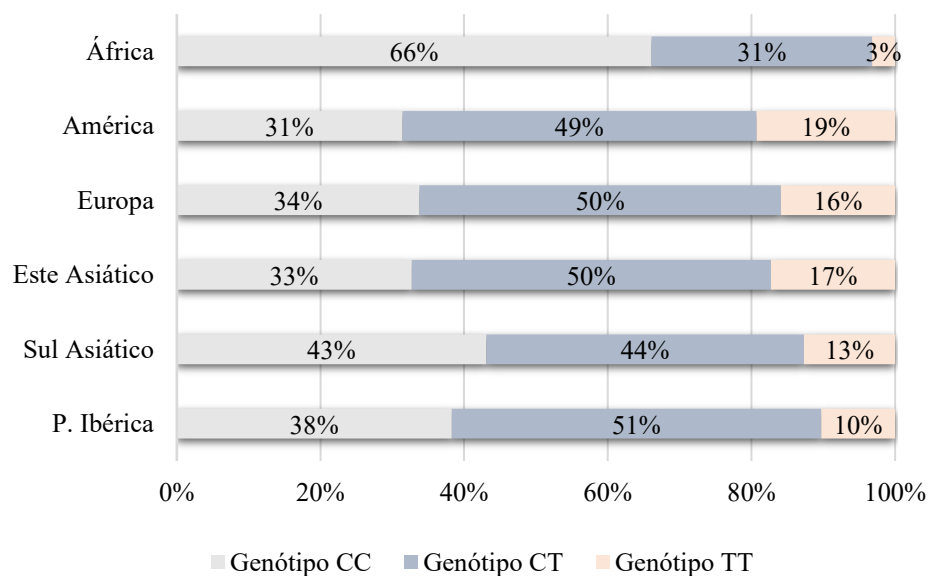


Figura 45. Distribuição genotípica para o polimorfismo MMP-8-799, em diferentes populações. Adaptado de: <https://www.ensembl.org/index.html>

Atualmente, excluindo a presente investigação, ainda não existe nenhum estudo efetuado na população portuguesa que relacione a presença deste polimorfismo com a periodontite. Possivelmente, os resultados obtidos seriam similares aos de outras populações europeias. Esta suposição prende-se com o facto de a população portuguesa poder possuir características próprias, relativamente às suas origens étnicas, que vão de encontro às características de outras populações europeias.

Em relação à associação deste polimorfismo com a periodontite, inúmeros estudos referem que uma amostra reduzida pode contribuir para a inconsistência estatística dos resultados obtidos. É, ainda, importante realçar que a disparidade observada nos estudos previamente mencionados, pode estar relacionada com o facto da seleção dos grupos controlo e doença ter sido efetuada por operadores diferentes e, consequentemente, poderem existir incoerências nas classificações.

Embora possa ser difícil chegar a uma conclusão definitiva sobre o papel do polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ na periodontite, uma vez que os estudos previamente analisados não estão em concordância e, apesar do presente estudo piloto apresentar algumas diferenças em relação a outros estudos publicados sobre esta temática, é inquestionável que, nesta investigação, os resultados obtidos corroboram esta associação. De facto, verifica-se que o alelo e os genótipos alterados foram mais prevalentes no grupo periodontite, comparativamente ao grupo controlo. Adicionalmente, estas diferenças revelaram-se estatisticamente significativas. Desta forma, é possível afirmar que, na presente investigação, indivíduos com este SNP são mais propensos a desenvolver periodontite.

Desta forma, acredita-se que estudos realizados em amostras maiores, assim como em populações com diferentes etnias, devem ser efetuados, de modo a perceber-se melhor a relação entre este polimorfismo e a etiopatogenia da periodontite (Alotaibi et al., 2020; Holla et al., 2012; Tsai et al., 2017). Adicionalmente, os resultados destes estudos serão importantes para a implementação de estratégias preventivas para o desenvolvimento da periodontite (Emingil et al., 2013; Li et al., 2016).

VI. CONCLUSÕES

A periodontite pode ser definida como uma doença crónica inflamatória multifatorial, iniciada pela presença de microrganismos periodontopatogénicos ao nível do biofilme bacteriano. Apesar de ser iniciada por estes agentes, são os fatores do hospedeiro que determinam a patogénese e a taxa de progressão da periodontite.

Neste sentido, verifica-se que a destruição tecidual resultante da resposta do hospedeiro a estes agentes, está, em grande parte, associada à metaloproteinase-8. Esta constitui uma enzima envolvida na degradação dos componentes da matriz extracelular, que desempenham um papel crucial na manutenção da integridade do tecido periodontal. Adicionalmente, a MMP-8 tem demonstrado estar associada ao desenvolvimento e progressão da periodontite.

Ao longo dos últimos anos, vários estudos têm sido realizados, com o intuito de compreender a associação da componente genética do hospedeiro, com o risco de desenvolver esta doença. Por conseguinte, o polimorfismo MMP-8⁻⁷⁹⁹ tem sido objeto de numerosos estudos, de forma a explorar a sua possível associação com a periodontite. No entanto, a relação entre este polimorfismo e a periodontite tem vindo a apresentar resultados controversos. Enquanto alguns estudos relatam que o alelo T está associado ao risco de desenvolver periodontite, outros não obtêm resultados que suportem esta associação. Assim, são necessários mais estudos para esclarecer o papel deste polimorfismo no desenvolvimento e progressão da periodontite.

No que concerne ao presente estudo piloto, verificou-se que nos indivíduos com periodontite, existia uma prevalência substancial do alelo T (alelo mutado), enquanto nos indivíduos com saúde periodontal o alelo mais prevalente era o alelo C, ou seja, o alelo sem mutação. Desta forma, com base nos dados obtidos, é possível afirmar que na presente investigação, o polimorfismo no promotor do gene da metaloproteinase 8 parece ser determinante para a suscetibilidade de desenvolvimento de periodontite, na população portuguesa.

Adicionalmente, este polimorfismo também tem sido implicado na modulação da expressão e atividade do gene MMP-8. Desta forma, o alelo T não só poderá estar associado ao risco de desenvolver periodontite, como também ao aumento da expressão e atividade da MMP-8 que, consequentemente, pode contribuir para o risco de desenvolver periodontite.

Considerando as diferenças existentes ao nível da suscetibilidade individual, torna-se fulcral compreender as interações entre o *background* genético e o desenvolvimento de periodontite. Neste sentido, a fim de implementar novos métodos de prevenção, diagnóstico e terapêuticos da periodontite, é imperativo que haja uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes à MMP-8, assim como aos polimorfismos do gene da MMP-8, particularmente ao nível dos SNPs nas posições -381 A/G, +17 C/G e -799 C/T.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alassiri, S., Parnanen, P., Rathnayake, N., Johannsen, G., Heikkinen, A. M., Lazzara, R., van der Schoor, P., van der Schoor, J. G., Tervahartiala, T., Gieselmann, D., & Sorsa, T. (2018). The Ability of Quantitative, Specific, and Sensitive Point-of-Care/Chair-Side Oral Fluid Immunotests for aMMP-8 to Detect Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Disease Markers*, 2018, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2018/1306396>
- Albandar, J. M., Susin, C., & Hughes, F. J. (2018). Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. *Journal of periodontology*, 89(1), S183–S203. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0480>
- 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>
- Almeida, R. F., Pinho, M. M., Lima, C., Faria, I., Santos, P., & Bordalo, E. C. (2006). Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*, 22(3), 379-90. <https://doi.org/10.32385/rpmgf.v22i3.10250>
- Alotaibi, D. H., Altalhi, A. M., Sambawa, Z. M., Koppolu, P., Alsinaidi, A. A., & Krishnan, P. (2020). The Association of Matrix Metalloproteinase Gene Polymorphisms and Periodontitis: An Overview. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(1), 37-42. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_136_20
- Armitage, G. C. (1999). Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1>
- Bascones-Martinez, A., Matesanz-Perez, P., Escribano-Bermejo, M., González-Moles, M. Á., Bascones-Ilundain, J., & Meurman, J. H. (2011). Periodontal disease and diabetes-Review of the literature. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 16(6), e722-e729. <https://doi.org/10.4317/medoral.17032>

- Berglundh, T., Armitage, G., Araujo, M. G., Avila-Ortiz, G., Blanco, J., Camargo, P. M., Chen, S., Cochran, D., Derks, J., Figuero, E., Hämmerle, C. H. F., Heitz-Mayfield, L. J. A., Huynh-Ba, G., Iacono, V., Koo, K. T., Lambert, F., McCauley, L., Quirynen, M., Renvert, S., ... Zitzmann, N. (2018). Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), S286–S291. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12957>
- Bermingham, N., & Luetlich, K. (2003). Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology*, 9(3), 159–164. [https://doi.org/10.1016/S0968-6053\(02\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0968-6053(02)00102-3)
- Birkedal-Hansen H. (1993). Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *Journal of periodontology*, 64(5), 474–484. <https://doi.org/10.1902/jop.1993.64.5s.474>
- Brettschneider, R. (1998). RFLP Analysis. *Molecular Tools for Screening Biodiversity*, 85-95. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0019-6_18
- Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), 177–186. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X)
- Canene-Adams, K. (2013). General PCR. *Methods in Enzymology*, 529, 291–298. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00024-0>
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*, 89(1), S1–S8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>
- Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M. L., Genco, R. J., Glogauer, M., Goldstein, M., Griffin, T. J., Holmstrup, P., Johnson, G. K., Kapila, Y., Lang, N. P., Meyle, J., Murakami, S., Plemons, J., Romito, G. A., ... Yoshie, H. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium:

- Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), S68–S77. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12940>
- 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>
- Chou, Y. H., Ho, Y. P., Lin, Y. C., Hu, K. F., Yang, Y. H., Ho, K. Y., Wu, Y. M., Hsi, E., & Tsai, C. C. (2011). MMP-8 -799 C>T genetic polymorphism is associated with the susceptibility to chronic and aggressive periodontitis in Taiwanese. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(12), 1078–1084. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01798.x>
- Chuang, L. Y., Yang, C. H., Tsui, K. H., Cheng, Y. H., Chang, P. L., Wen, C. H., & Chang, H. W. (2008). Restriction Enzyme Mining for SNPs in Genomes. *Anticancer research*, 28(4A), 2001-2007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18649739/>
- Coventry, J., Griffiths, G., Scully, C., & Tonetti, M. (2000). ABC of oral health: Periodontal disease. *BMJ (Clinical research ed.)*, 321(7252), 36–39. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7252.36>
- Darby, I. (2022). Risk factors for periodontitis & peri-implantitis. *Periodontology 2000*, 90(1), 9–12. <https://doi.org/10.1111/prd.12447>
- de Moraes, E. F., Pinheiro, J. C., Leite, R. B., Santos, P. P. A., Barboza, C. A. G., & Freitas, R. A. (2018). Matrix metalloproteinase-8 levels in periodontal disease patients: A systematic review. *Journal of Periodontal Research*, 53(2), 156–163. <https://doi.org/10.1111/jre.12495>
- Dyke, T. E. V., & Dave, S. (2005). Risk Factors for Periodontitis. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 7(1), 3-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15736889/>

- Emingil, G., Han, B., Gürkan, A., Berdeli, A., Tervahartiala, T., Salo, T., Pussinen, P. J., Köse, T., Atilla, G., & Sorsa, T. (2014). Matrix Metalloproteinase (MMP)-8 and Tissue Inhibitor of MMP-1 (TIMP-1) Gene Polymorphisms in Generalized Aggressive Periodontitis: Gingival Crevicular Fluid MMP-8 and TIMP-1 Levels and Outcome of Periodontal Therapy. *Journal of Periodontology*, 85(8), 1070–1080. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.130365>
- Flemmig T. F. (1999). Periodontitis. *Annals of periodontology*, 4(1), 32–38. <https://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.32>
- Franco, C., Patricia, H. R., Timo, S., Claudia, B., & Marcela, H. (2017). Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 440. <https://doi.org/10.3390/ijms18020440>
- Fullmer, H. M., Gibson, W. A., Lazarus, G. S., Bladen, H. A., & Whedon, K. A. (1969). The Origin of Collagenase in Periodontal Tissues of Man. *Journal of Dental Research*, 48(5), 646–651. <https://doi.org/10.1177/00220345690480050701>
- Gariyban, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Genco, R. J. (1996). Current View of Risk Factors for Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology*, 67(10), 1041–1049. <https://doi.org/10.1902/jop.1996.67.10s.1041>
- Gupta, S., Sahni, V., Räisänen, I. T., Grigoriadis, A., Sakellari, D., Gieselmann, D. R., & Sorsa, T. (2023). Linking oral microbial proteolysis to aMMP-8 PoC diagnostics along with the stage and grade of periodontitis: A cross-sectional study. *Oral Diseases*, 29(1), 285–289. <https://doi.org/10.1111/odi.14008>
- Heikkinen, A. M., Kettunen, K., Kovanen, L., Haukka, J., Elg, J., Husu, H., Tervahartiala, T., Pussinen, P., Meurman, J., & Sorsa, T. (2016). Inflammatory mediator polymorphisms associate with initial periodontitis in adolescents. *Clinical and Experimental Dental Research*, 2(3), 208–215. <https://doi.org/10.1002/cre2.40>
- Hernández, M., Baeza, M., Räisänen, I. T., Contreras, J., Tervahartiala, T., Chaparro, A., Sorsa, T., & Hernández-Ríos, P. (2021). Active MMP-8 Quantitative Test as an

- Adjunctive Tool for Early Diagnosis of Periodontitis. *Diagnostics*, 11(8), 1503. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11081503>
- Hernández, M., Vernal, R., Sorsa, T., Tervahartiala, T., Mäntylä, P., & Gamonal, J. (2012). The Role of Immuno-Inflammatory Response in the Pathogenesis of Chronic Periodontitis and Development of Chair-Side Point of Care Diagnosis. In N. Buduneli (Ed.), *Pathogenesis and Treatment of Periodontitis* (pp. Ch. 3). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/32658>
- Hernández-Rios, P., Hernández, M., Tervahartiala, T., Leppilähti, J., Kuula, H., Mäntylä, P., Rathnayake, N., Nwhator, S., Heikkinen, A. M., Garrido, M., & Sorsa, T. (2016). Oral fluid matrix metalloproteinase (MMP)-8 as a diagnostic tool in chronic periodontitis. *Metalloproteinases In Medicine*, 3, 11-18. <https://doi.org/10.2147/MNM.S89245>
- Holla, L. I., Hrdlickova, B., Vokurka, J., & Fassmann, A. (2012). Matrix metalloproteinase 8 (MMP8) gene polymorphisms in chronic periodontitis. *Archives of Oral Biology*, 57(2), 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.08.018>
- Hunt, S. E., McLaren, W., Gil, L., Thormann, A., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Parton, A., Armean, I. M., Trevanion, S. J., Flicek, P., & Cunningham, F. (2023, Fevereiro 01). *Population genetics - homo_sapiens*. Ensembl Genome Browser. https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=11:102725249-102726249;v=rs11225395;vdb=variation;vf=167876416
- Ingman, T., Sorsa, T., Michaelis, J., & Kontinen, Y. T. (1994). Matrix Metalloproteinases-1, -3, and -8 in Adult Periodontitis in Situ. An Immunohistochemical Study. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 732(1), 459–461. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb24785.x>
- Ismail, S., & Essawi, M. (2012). Genetic polymorphism studies in humans. *Middle East Journal of Medical Genetics*, 1(2), 57–63. <https://doi.org/10.1097/01.MXE.0000415225.85003.47>

- Jaber, B. L., Liangos, O., Pereira, B. J. G., & Balakrishnan, V. S. (2004). Polymorphism of Immunomodulatory Cytokine Genes: Implications in Acute Renal Failure. *Blood Purification*, 22(1), 101–111. <https://doi.org/10.1159/000074930>
- Jepsen, S., Caton, J. G., Albandar, J. M., Bissada, N. F., Bouchard, P., Cortellini, P., Demirel, K., de Sanctis, M., Ercoli, C., Fan, J., Geurs, N. C., Hughes, F. J., Jin, L., Kantarci, A., Lalla, E., Madianos, P. N., Matthews, D., McGuire, M. K., Mills, M. P., ... Yamazaki, K. (2018). Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions: Classification and case definitions for periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), S219–S229. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12951>
- Jiang, L., Weng, H., Chen, M. Y., Zhang, C., & Zeng, X. T. (2014). Association between cyclooxygenase-2 gene polymorphisms and risk of periodontitis: A meta-analysis involving 5653 individuals. *Molecular Biology Reports*, 41(7), 4795–4801. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3350-z>
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2011). Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81–97. <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>
- Khuda, F., Anuar, N. N. M., Baharin, B., & Nasruddin, N. S. (2021). A mini review on the associations of matrix metalloproteinases (MMPs) -1, -8, -13 with periodontal disease. *AIMS Molecular Science*, 8(1), 13–31. <https://doi.org/10.3934/molsci.2021002>
- Kiili, M., Cox, S. W., Chen, H. W., Wahlgren, J., Maisi, P., Eley, B. M., Salo, T., & Sorsa, T. (2002). Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: Molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue: MMP-8 and MMP-13 in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(3), 224–232. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2002.290308.x>

- Kinane, D. F., & Hart, T. C. (2003). Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14(6), 430–449. <https://doi.org/10.1177/154411130301400605>
- Kinane, D. F., Shiba, H., & Hart, T. C. (2005). The genetic basis of periodontitis. *Periodontology* 2000, 39(1), 91–117. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00118.x>
- Lazarus, G. S., Brown, R. S., Daniels, J. R., & Fullmer, H. M. (1968). Human Granulocyte Collagenase. *Science*, 159(3822), 1483–1485. <https://doi.org/10.1126/science.159.3822.1483>
- Leaché, A. D., & Oaks, J. R. (2017). The Utility of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Data in Phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 48(1), 69–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110316-022645>
- Lee, W., Aitken, S., Sodek, J., & McCulloch, C. A. (1995). Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *Journal of periodontal research*, 30(1), 23–33. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1995.tb01249.x>
- Li, W., Zhu, Y., Singh, P., Ajmera, D. H., Song, J., & Ji, P. (2016). Association of Common Variants in MMPs with Periodontitis Risk. *Disease Markers*, 2016, 1545974. <https://doi.org/10.1155/2016/1545974>
- Luchian, I., Goriuc, A., Sandu, D., & Covasa, M. (2022). The Role of Matrix Metalloproteinases (MMP-8, MMP-9, MMP-13) in Periodontal and Peri-Implant Pathological Processes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1806. <https://doi.org/10.3390/ijms23031806>
- Muñoz-Carrillo, J. L., Hernández-Reyes, V. E., García-Huerta, O. E., Chávez-Ruvalcaba, F., Chávez-Ruvalcaba, M. I., hávez-Ruvalcaba, K. M., & Díaz-Alfaro, L. (2020). Pathogenesis of Periodontal Disease. In N. M. A. Yussif (Ed.), *Periodontal Disease—Diagnostic and Adjunctive Non-surgical Considerations* (pp. 1-14). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86548>

- Majumder, P., Ghosh, S., & Dey, S. K. (2019). Matrix metalloproteinase gene polymorphisms in chronic periodontitis: A case-control study in the Indian population. *Journal of Genetics*, 98(1), 32. <https://doi.org/10.1007/s12041-019-1077-2>
- Manicone, A. M., & Mcguire, J. K. (2008). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(1), 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.07.003>
- Marcaccini, A. M., Meschiari, C. A., Zuardi, L. R., de Sousa, T. S., Taba, M., Teofilo, J. M., Jacob-Ferreira, A. L. B., Tanus-Santos, J. E., Novaes, A. B., & Gerlach, R. F. (2010). Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, 37(2), 180–190. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01512.x>
- Matsuda, K. (2017). PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation. *Advances in Clinical Chemistry*, 80, 45–72. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.11.002>
- McCrudden, 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>
- Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
- Murthykumar, K., Varghese, S., & Priyadharsini, J. V. (2019). Association of MMP8 (-799C/T) (rs11225395) gene polymorphism and chronic periodontitis. *Drug Invention Today*, 11(7), 1594-1597. https://www.researchgate.net/publication/334491317_Association_of_MMP8-799CTrs11225395_gene_polymorphism_and_chronic_periodontitis
- Nazir, M. A. (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International Journal of Health Sciences*, 11(2), 72-80. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28539867/>

- Nazir, M., Al-Ansari, A., Al-Khalifa, K., Alhareky, M., Gaffar, B., & Almas, K. (2020). Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *The Scientific World Journal*, 2020, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/2146160>
- Page, R. C., & Kornman, K. S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: An introduction. *Periodontology 2000*, 14(1), 9–11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00189.x>
- Page, R. C., & Schroeder, H. E. (1976). Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 34(3), 235–249. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/765622/>
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kebschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., ... Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89(1), S173-S182. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>
- Passoja, A., Ylipalosaari, M., Tervonen, T., Raunio, T., & Knuuttila, M. (2008). Matrix metalloproteinase-8 concentration in shallow crevices associated with the extent of periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(12), 1027–1031. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01329.x>
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet (London, England)*, 366(9499), 1809–1820. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67728-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67728-8)
- Machado, V., Botelho, J., Neves, J. N., 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 e Cirurgia Maxilofacial*, 61(1), 10-16. <http://doi.org/10.24873/j.rpemd.2020.03.693>

- Petersen, P. E., & Ogawa, H. (2005). Strengthening the Prevention of Periodontal Disease: The WHO Approach. *Journal of Periodontology*, 76(12), 2187–2193. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.12.2187>
- Rai, B., Kharb, S., Jain, R., & Anand, S. C. (2008). Biomarkers of periodontitis in oral fluids. *Journal of Oral Science*, 50(1), 53–56. <https://doi.org/10.2334/josnusd.50.53>
- Rasmussen, H. (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. In S. Magdeldin (Ed.), *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* (pp. 315-334). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/37724>
- Reddy, M. S., Palcanis, K. G., & Geurs, N. C. (1997). A comparison of manual and controlled-force attachment-level measurements. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(12), 920–926. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1997.tb01212.x>
- Romanelli, R., Mancini, S., Laschinger, C., Overall, C. M., Sodek, J., & McCulloch, C. A. G. (1999). Activation of Neutrophil Collagenase in Periodontitis. *Infection and Immunity*, 67(5), 2319–2326. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.5.2319-2326.1999>
- Romero-Castro, N. S., Vázquez-Villamar, M., Muñoz-Valle, J. F., Reyes-Fernández, S., Serna-Radilla, V. O., García-Arellano, S., & Castro-Alarcón, N. (2020). Relationship between TNF- α , MMP-8, and MMP-9 levels in gingival crevicular fluid and the subgingival microbiota in periodontal disease. *Odontology*, 108(1), 25–33. <https://doi.org/10.1007/s10266-019-00435-5>
- Sahingur, S. E., & Cohen, R. E. (2004). Analysis of host responses and risk for disease progression. *Periodontology 2000*, 34(1), 57–83. <https://doi.org/10.1046/j.0906-6713.2002.003425.x>
- Séguier, S., Gogly, B., Bodineau, A., Godeau, G., & Brousse, N. (2001). Is Collagen Breakdown During Periodontitis Linked to Inflammatory Cells and Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Human

- Gingival Tissue? *Journal of Periodontology*, 72(10), 1398–1406. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.10.1398>
- Shen, T. C., Hsia, T. C., Chao, C. Y., Chen, W. C., Chen, C. Y., Chen, W. C., Lin, Y. T., Hsiao, C. L., Chang, W. S., Tsai, C. W., & Bau, D. T. (2017). The Contribution of *MMP-8* Promoter Polymorphisms in Lung Cancer. *Anticancer research*, 37(7), 3563–3567. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11726>
- Smith, M., Seymour, G. J., & Cullinan, M. P. (2010). Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 53(1), 45–54. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00354.x>
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134–144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x>
- Song, G. G., & Lee, Y. H. (2013). Associations between FCGR2A rs1801274, FCGR3A rs396991, FCGR3B NA1/NA2 polymorphisms and periodontitis: A meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, 40(8), 4985–4993. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2599-y>
- Sorsa, T., Alassiri, S., Grigoriadis, A., Räisänen, I. T., Pärnänen, P., Nwhator, S. O., Gieselmann, D.-R., & Sakellari, D. (2020). Active MMP-8 (aMMP-8) as a Grading and Staging Biomarker in the Periodontitis Classification. *Diagnostics*, 10(2), 61. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10020061>
- Sorsa, T., Gursoy, U. K., Nwhator, S., Hernández, M., Tervahartiala, T., Leppilahti, J., Gursoy, M., Könönen, E., Emingil, G., Pussinen, P. J., & Mäntylä, P. (2016). Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 70(1), 142–163. <https://doi.org/10.1111/prd.12101>
- Sorsa, T., Heikkinen, A. M., Leppilahti, J., Tervahartiala, T., Nwhator, S., Rathnayake, N., Mäntylä, P., Gieselmann, D.-R., & Netuschil, L. (2018). Active Matrix Metalloproteinase-8: Contributor to Periodontitis and a Missing Link Between Genetics, Dentistry, and Medicine. In N. Bostanci & G. N. Belibasakis (Eds.),

- Pathogenesis of Periodontal Diseases* (pp. 51–57). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53737-5_5
- Sorsa, T., Suomalainen, K., & Uitto, V. J. (1990). The role of gingival crevicular fluid and salivary interstitial collagenases in human periodontal diseases. *Archives of Oral Biology*, 35, S193–S196. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(90\)90156-5](https://doi.org/10.1016/0003-9969(90)90156-5)
- Sorsa, T., Tjäderhane, L., Konttinen, Y. T., Lauhio, A., Salo, T., Lee, H., 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>
- Southern E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98(3), 503–517. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(75\)80083-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(75)80083-0)
- Stabholz, A., Soskolne, W. A., & Shapira, L. (2010). Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 53(1), 138–153. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00340.x>
- Takashiba, S., & Naruishi, K. (2006). Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontology 2000*, 40(1), 94–106. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00142.x>
- Teama, S. (2018). DNA Polymorphisms: DNA-Based Molecular Markers and Their Application in Medicine. In Y. Liu (Ed.), *Genetic Diversity and Disease Susceptibility*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79517>
- Templeton, N. S. (1992). The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagnostic molecular pathology*, 1(1), 52–72. <https://doi.org/10.1097/00019606-199203000-00008>
- 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), S149–S161. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12945>

- Trombelli, L., Farina, R., Silva, C. O., & Tatakis, D. N. (2018). Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), S44–S67. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12939>
- Tsai, C-C., Chou, Y-C., Lin, Y-C., Wu, Y-M., & Ho, K.Y. (2017). Matrix Metalloproteinase Gene Polymorphisms in Periodontitis in Taiwanese Population. *Modern Research in Dentistry*, 1(2), 42-45. <https://doi.org/10.31031/MRD.2017.01.000510>
- Uitto, V. J., Overall, C. M., & McCulloch, C. (2003). Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontology* 2000, 31(1), 77–104. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2003.03106.x>
- Uitto, V. J., & Raeste, A. M. (1978). Activation of Latent Collagenase of Human Leukocytes and Gingival Fluid by Bacterial Plaque. *Journal of Dental Research*, 57(7–8), 844–851. <https://doi.org/10.1177/00220345780570071401>
- Umezudike, K., Räisänen, I., Gupta, S., Nwhator, S., Grigoriadis, A., Sakellari, D., & Sorsa, T. (2022). Active matrix metalloproteinase-8: A potential biomarker of oral systemic link. *Clinical and Experimental Dental Research*, 8(1), 359–365. <https://doi.org/10.1002/cre2.516>
- Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. A. C., de Souza, P. R. E., Carvalho, A. A. T., & Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 1–11. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001>
- Weng, H., Yan, Y., Jin, Y. H., Meng, X. Y., Mo, Y. Y., & Zeng, X. T. (2016). Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and periodontitis susceptibility: A meta-analysis involving 6,162 individuals. *Scientific Reports*, 6(1), 24812. <https://doi.org/10.1038/srep24812>
- Yan, C., & Boyd, D. D. (2007). Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *Journal of Cellular Physiology*, 211(1), 19–26. <https://doi.org/10.1002/jcp.20948>

- Yousefi, S., Abbassi-Daloui, T., Kraaijenbrink, T., Vermaat, M., Mei, H., van 't Hof, P., van Iterson, M., Zhernakova, D. V., Claringbould, A., Franke, L., 't Hart, L. M., Sliker, R. C., van der Heijden, A., de Knijff, P., & 't Hoen, P. A. C. (2018). A SNP panel for identification of DNA and RNA specimens. *BMC Genomics*, 19(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4482-7>
- Zhang, L., Li, X., Yan, H., & Huang, L. (2018). Salivary matrix metalloproteinase (MMP)-8 as a biomarker for periodontitis: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 97(3), e9642. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009642>

VIII. ANEXOS

Anexo 1 (Carta de aprovação da Comissão de Ética do IUEM)

Comissão de Ética EGAS MONIZ



Proc. Interno nº 922

Ex.ma Senhora
Profª. Doutora Madalena Oom

Monte de Caparica, 25 de fevereiro de 2021.

Ex.ma Senhora,

Em resposta ao Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado **“Relação entre polimorfismos no promotor dos genes das metalopeptidases 8 e 9, atividade proteolítica e a suscetibilidade à periodontite numa população Portuguesa”**, foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Profª. Doutora Maria  Fernanda de Mesquita

Anexo 2 (Consentimento Informado)



Consentimento Informado

Código | IMP:EM.PE.17_02

Monte de Caparica, ____ de _____ 20__

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito do curso de Mestrado Integrado em Medicina Dentária do Instituto Universitário Egas Moniz, sob a orientação da Prof. Doutora Isabel Barahona, Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro e do Prof. Doutor Ricardo Alves, solicita-se autorização para a participação no estudo “Associação dos polimorfismos dos promotores dos genes das metaloproteinases 8 e 9 com a periodontite – estudo piloto”.

O estudo tem como objetivo avaliar os fatores de risco genéticos para o desenvolvimento da periodontite (inflamação e perda de osso à volta do dente) a partir de amostras recolhidas da mucosa oral, 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 acerca de dados relevantes da história clínica e iii) recolha de uma amostra de células da mucosa oral por meio duma zaragatoa, um dispositivo semelhante a um cotonete.

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.

(Riscar o que não interessa)

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

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

Anexo 3 (Questionário)



INSTITUTO
UNIVERSITÁRIO
EGAS MONIZ

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:

Cumpre critérios de Inclusão SIM ☐ NÃO ☐