



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**NÍVEIS DE NITRITO NA SALIVA E NO FLUIDO CREVICULAR E
A SUA CORRELAÇÃO COM A SEVERIDADE DA
PERIODONTITE – UM ESTUDO PILOTO**

Trabalho submetido por
Inês Soraia Avelãs Alves
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2021



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

NÍVEIS DE NITRITO NA SALIVA E NO FLUIDO CREVICULAR E A SUA CORRELAÇÃO COM A SEVERIDADE DA PERIODONTITE – UM ESTUDO PILOTO

Trabalho submetido por
Inês Soraia Avelãs Alves
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Maria Gabriela Almeida
e coorientado por
Prof. Doutor Ricardo Almeida Castro Alves

setembro de 2021

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Doutora Maria Gabriela Almeida, pela paciência, motivação e rigor fundamentais para a realização deste trabalho. O meu especial agradecimento.

Ao meu coorientador, Prof. Doutor Ricardo Almeida Castro Alves, pela disponibilidade, orientação, empenho e pelos conhecimentos transmitidos. O meu eterno respeito.

À Prof. Doutora Madalena Oom, pela preocupação e preciosa colaboração. Muito obrigada.

Ao Prof. Doutor Luís Proença, pelo conhecimento estatístico e pela assistência prestada.

Em especial, aos meus pais, os meus pilares, o meu eterno agradecimento. Foram eles que durante 5 anos me apoiaram incondicionalmente. Foram eles que permitiram a concretização deste curso. Muito obrigada pelo carinho e apoio essenciais durante todo este percurso.

À minha irmã, Sílvia, que é a minha eterna confidente e a minha inspiração. Pelo carinho, apoio, compreensão e por acreditar em mim.

Aos meus avós, que sempre exprimiram o orgulho que têm por mim e por me motivarem a dar o meu melhor.

Ao Paulo, pelo apoio, incentivo e carinho ao longo deste caminho.

À minha pequenina sobrinha, Matilde, que este ano veio iluminar a minha vida e que me deixou o coração mais quente e alegre.

Aos meus colegas de Box, Camila Lameira e Fabiano Barbosa que foram o meu grande apoio este ano. Obrigada pela partilha de conhecimentos e carinho.

A todos os meus colegas e amigos, especialmente à minha amiga Beatriz Morgado, pela ajuda na concretização deste trabalho e pela cumplicidade durante estes 5 anos.

RESUMO

Introdução: O diagnóstico e a classificação das doenças periodontais baseiam-se essencialmente em parâmetros clínicos, pelo que fornecem apenas informação sobre a destruição causada pela doença no passado. Assim, será de todo o interesse desenvolver novas ferramentas auxiliares de diagnóstico baseadas na análise dos fluidos orais, como a saliva e o fluido crevicular gengival (FCG).

Objetivos: Este estudo piloto tem como objetivos comparar os níveis de nitrito na saliva e no FCG, em indivíduos com e sem periodontite e avaliar a correlação entre os níveis de nitrito e os diferentes estadios e graus da doença periodontal.

Materiais e métodos: Este estudo observacional incluiu 27 utentes adultos da Clínica Dentária Egas Moniz, que foram divididos em 2 grupos: Grupo A (n=13) - participantes periodontalmente saudáveis e o Grupo B (n=14) - participantes com periodontite. Após o preenchimento de um questionário e recolha de dados clínicos, foi efetuado um diagnóstico periodontal que incluiu a avaliação dos seguintes parâmetros: Índice de Placa, Índice Gengival, Profundidade de Sondagem e Recessão Gengival. Foram recolhidas amostras de saliva não-estimulada e amostras de fluido crevicular gengival.

Resultados: Devido à reduzida amostra deste estudo, não foi possível chegar a conclusões estatisticamente válidas. A partir de uma análise descritiva, observou-se uma tendência para alguns fatores aumentarem os valores de concentração de nitrito tanto na saliva, como no FCG.

Conclusões: A partir dos resultados obtidos, parece haver uma relação entre os valores de nitrito, a severidade e a progressão da doença periodontal. Contudo, devido ao reduzido tamanho da amostra as variações observadas estão dentro do erro experimental assim, não é possível tirar conclusões definitivas.

Palavras-chave: Doença periodontal; nitrito; saliva; fluido crevicular gengival.

ABSTRACT

Background: Diagnosis and classification of periodontal diseases are essentially based on clinical parameters, so they only provide information about the destruction caused by the disease in the past. Thus, it will be of great interest to develop new auxiliary diagnostic tools based on the analysis of oral fluids, such as saliva and gingival crevicular fluid (GCF).

Objectives: This pilot study aims to compare nitrite levels in saliva and GCF, in individuals with and without periodontitis and to evaluate the correlation between nitrite levels and different stages and degrees of periodontal disease.

Materials and methods: This observational study included 27 adult patients of Clínica Dentária Egas Moniz, which were divided into 2 groups: Group A (n = 13) - periodontally healthy participants and Group B (n = 14) - participants with periodontitis. After filling out a questionnaire by the participants and collecting clinical data, a periodontal diagnosis was made, which included an assessment of the following parameters: Plaque Index, Gingival Index, Probing Depth and Gingival Recession. Unstimulated saliva and gingival crevicular fluid were collected.

Results: Due to the small sample of this study, it was not possible to reach statistically valid conclusions. From a descriptive analysis, a tendency was observed for some factors to increase the nitrite concentration values in both saliva and FCG.

Conclusions: From the results obtained, there seems to be a relationship between the nitrite values, the severity and the progression of periodontal disease. However, due to the small sample size the variations observed are within the experimental error thus, it is not possible to draw definitive conclusions.

Keywords: Periodontal disease; nitrite; saliva; gingival crevicular fluid.

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO.....	17
1. Periodonto	17
1.1. Anatomia do periodonto	17
1.1.1. Gengiva	17
1.1.2. Ligamento periodontal	19
1.1.3. Cimento radicular	20
1.1.4. Osso alveolar	20
2. Doença periodontal.....	21
2.1. Epidemiologia da doença periodontal.....	21
2.1.1. Prevalência e incidência da doença periodontal em Portugal	22
2.2. Fatores de risco da doença periodontal	24
2.3. Classificação da doença periodontal.....	26
3. Óxido nítrico	29
3.1. Papel fisiológico (patofisiológico) do NO	29
3.2. Biossíntese do NO	30
3.2.1. Via clássica L-arginina – NO-sintase.....	30
3.2.2. Via nitrato - nitrito - NO	31
3.3. Visão integrada do NO e outros óxidos de azoto.....	32
3.3.1. Aplicações clínicas do nitrito	32
3.3.2. Concentrações de nitrito, dieta e bactérias comensais orais	33
3.4. Doença periodontal e o NO	36
3.4.1. Biomarcadores da doença periodontal	37
3.5. Medição do nitrito.....	38
3.5.1. Recolha de fluidos orais para a medição de biomarcadores da doença periodontal.....	39

4. Hipóteses	40
5. Objetivos	40
II. MATERIAIS E MÉTODOS	41
1. Considerações éticas	41
2. Materiais e reagentes utilizados	41
2.1. Materiais para recolha das amostras	41
2.2. Reagentes	42
2.3. Equipamentos.....	42
3. Estudo clínico	42
3.1. Seleção da amostra.....	42
3.2. Critérios de inclusão e critérios de exclusão	43
3.3. Recolha de dados	43
3.3.1. Questionário	43
3.3.2. História clínica	44
3.4. Protocolo clínico	44
3.4.1. Recolha da saliva.....	45
3.4.2. Recolha do fluido crevicular gengival	46
3.5. Quantificação de nitrito pelo método colorimétrico de Griess	47
3.5.1. Lei de Beer-Lambert (absorvância vs concentração).....	47
3.5.2. Preparação da solução nitrito e reagentes SA e NEDA	48
3.5.3. Análise das amostras	48
3.6. Ensaio controlo	51
3.7. Exclusão do estudo	52
3.8. Análise estatística	52
III. RESULTADOS	53
1. Calibração	53

1.1. Quantificação do nitrito pelo método de Griess	53
1.2. Determinação do volume de amostra de FCG recolhido nas tiras de papel	54
2. Relação entre as concentrações de nitrito na saliva e no FCG em pacientes com doença periodontal e em pacientes periodontalmente saudáveis	55
3. Relação entre as concentrações de nitrito na saliva e no FCG e o estadio da doença periodontal	55
4. Relação entre as concentrações de nitrito na saliva e no FCG e o grau da doença periodontal	56
5. Relação entre os fatores de risco e as concentrações de nitrito na saliva e no fluido crevicular gengival.....	57
IV. DISCUSSÃO.....	65
V. CONCLUSÕES.....	71
VI. BIBLIOGRAFIA.....	73
VII. ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- <i>Composição tecidual do periodonto.</i> (Adaptado de Lindhe et al., 2003). ..	17
Figura 2- <i>Corte histológico representativo da composição da gengiva e da área de contacto entre a gengiva e o esmalte (E).</i> (Adaptado de Lindhe et al., 2003).	19
Figura 3- <i>A: Medição das dimensões do sulco gengival através de uma sonda periodontal em saúde oral; B: Medição das dimensões do sulco gengival através de uma sonda periodontal na presença de recessão gengival; C: Medição das dimensões do sulco gengival através de uma sonda periodontal na presença de hiperplasia gengival.</i> (Adaptado de Lindhe et al., 2003).	19
Figura 4- <i>Ilustração da posição do ligamento periodontal entre o cemento radicular e o osso alveolar e representação das fibras do ligamento.</i> (Adaptado de Lindhe et al., 2003).	21
Figura 5- <i>A e B: Representação numerária da prevalência e da incidência em Portugal de 1990 a 2019; C e D: Representação percentual da prevalência e da incidência em Portugal de 1990 a 2019.</i> Linha verde- representação da evolução da doença periodontal na população da Europa Ocidental. Linha roxa- representação da evolução da doença periodontal na população portuguesa. (Adaptado do <i>Institute for Health Metrics and Evaluation [IHME]</i> , 2021).	23
Figura 6- <i>Representação esquemática da influência do stress psicológico na doença periodontal.</i> (Adaptado de Reners & Brex, 2007).	25
Figura 7- <i>Formação do NO em normóxia (via clássica).</i> (Adaptado de Ghalayini, 2004).	30
Figura 8- <i>Equilíbrio de formação de NO pela via clássica e pela via nitrato - nitrito - NO.</i> (Adaptado de Lundberg et al., 2008).	31
Figura 9- <i>Esquematização do metabolismo de nitrato, nitrito e NO, composto pela via L-arginina – NO-sintase e pela via nitrato - nitrito - NO.</i> (Adaptado de Karwowska & Kononiuk, 2020).	32
Figura 10- <i>Reações químicas envolvidas na quantificação de nitrito (NO₂⁻) através da reação de Griess.</i> (Adaptado de Vishwakarma et al., 2019).	39

Figura 11- A: Auxiliar de recolha da saliva (SCA); B: Frasco de colheita/ criogénico (cryovials); C: Composição do kit de recolha de amostras de saliva da Salimetrics®. ...	41
Figura 12- Tiras de papel PerioPaper® Gengival Fluid Collection Strips.	41
Figura 13- Micropipetas Microcapillary tube Drummond Microcaps®.	42
Figura 14- Método de recolha da amostra de saliva. A: Frasco de colheita (cryovials) devidamente rotulado; B: Frasco de colheita com o auxiliar de recolha da saliva (SCA); C: Frasco de colheita com saliva; D: Caixa térmica a 4°C; E: Momento da recolha da amostra de saliva.	45
Figura 15- Método de recolha da amostra de fluido crevicular gengival com os PerioPaper® Gengival Fluid Collection Strips.	46
Figura 16- Método de recolha da amostra de fluido crevicular gengival. A: Recolha da amostra com os PerioPaper® Gengival Fluid Collection Strips; B: Primeiros tubos de eppendorf devidamente identificados com as tiras de papel; C: Leitura dos volumes da amostra pelo Periotron® 8010; D: Segundos tubos de eppendorf com as tiras de papel com o volume medido; E: Caixa térmica a 4°C.	47
Figura 17- Tubos de eppendorf devidamente identificados (código atribuído a cada paciente).	47
Figura 18- A: Equação da Lei de Beer-Lambert; B: Espectrofotómetro: processo de incidência de luz e transmissão de luz através da cuvete com a solução.	48
Figura 19- Protocolo do método de Griess para a saliva. 1A: Frasco de colheita (cryovials); 1B: Frasco de colheita com saliva; 1C: Transferência da saliva para o tubo de eppendorf; 1D: Centrifugação dos tubos de eppendorf a 10.000 x g durante 10 minutos; 2A: Obtenção do sobrenadante; 2B e 2C: Transferência de 25 µl e de 50 µl de sobrenadante para uma cuvete; 2D e 2E: Adição de 975 e 950 µl de água destilada; 3A e 3B: Adição do reagente SA; 3C e 3D: Adição do reagente NEDA; 4: Esperar 10 minutos; 5: Análise das amostras pelo espectrofotómetro.	50
Figura 20- Protocolo do método de Griess para o fluido crevicular gengival. 1A: 6 tiras de papel no tubo de eppendorf; 1B: Corte da parte colorida de laranja dos papéis; 1C: Parte branca absorvente dos papéis na cuvete; 1D: Adição de 1000 µl de água destilada;	

2A: Adição do reagente SA; 2B: Adição do reagente NEDA; 3: Esperar 10 minutos; 4: Análise das amostras pelo espectrofotómetro.	51
Figura 21- Cuvete com as 6 tiras de PerioPaper® Gengival Fluid Collection Strips, solução SA e NEDA, sem coloração.	52
Figura 22- Curva de calibração para quantificação de nitrito pelo método de Griess. Parâmetros: $y = 0,0588x + 0,112$; $r^2 = 0,997$	54
Figura 23- Curva de calibração. Parâmetros: $y = -203,42x^4 + 497,92x^3 - 435,3x^2 + 319,78x - 6,2895$; $r^2 = 0,9994$	54
Figura 24- Representação gráfica da percentagem de pacientes de cada estadio da doença periodontal.	56
Figura 25- Representação gráfica da percentagem de pacientes de cada grau da doença periodontal.	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Classificação da periodontite com base no estadio. (Adaptado de Steffens & Marcantonio, 2018).	28
Tabela 2- Classificação da periodontite com base no grau. (Adaptado de Steffens & Marcantonio, 2018).	29
Tabela 3- Concentrações de nitrito na saliva e no fluido crevicular gengival em diferentes condições.	35
Tabela 4- Soluções, reagentes e quantidades necessárias para a reação de Griess.	48
Tabela 5- Concentrações e volumes para preparação da solução padrão nitrito (1 ml).	53
Tabela 6- Influência do diagnóstico periodontal nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.	55
Tabela 7- Influência do estadio nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.	56
Tabela 8- Influência do grau nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.	57
Tabela 9- Influência do gênero nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.	58
Tabela 10- Influência da idade nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG. ...	58
Tabela 11- Influência das patologias sistêmicas nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.	58
Tabela 12- Influência da toma de medicação nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.	59
Tabela 13- Influência do stress psicológico nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.	59
Tabela 14- Influência do cansaço físico nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.	59
Tabela 15- Influência da ansiedade nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.	60

Tabela 16- <i>Influência da sensação de boca seca nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.</i>	60
Tabela 17- <i>Influência do tabagismo nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.</i>	60
Tabela 18- <i>Influência da variável “ex-fumador” nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.</i>	61
Tabela 19- <i>Influência do consumo de bebidas alcoólicas nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.</i>	61
Tabela 20- <i>Influência da ingestão de água nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.</i>	61
Tabela 21- <i>Influência do consumo regular de vegetais e frutas nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.</i>	62
Tabela 22- <i>Influência do consumo regular de carnes processadas nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.</i>	62
Tabela 23- <i>Influência da suplementação vitamínica nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.</i>	63

LISTA DE SIGLAS

ADN- Ácido desoxirribonucleico

eNOS- NOS endotelial

FCG- Fluido crevicular gengival

HbA1c- Hemoglobina glicada

iNOS- NOS induzível

NED/NEDA- N-(1-naftil)-etilenodiamina

nNOS- NOS neural

NO- Óxido nítrico

NO₂⁻ - Nitrito

NO₃⁻ - Nitrato

NOS- Óxido nítrico sintases

SA- Sulfanilamida

SCA- *Saliva Collection Aid*

UV- Radiação ultravioleta

I. INTRODUÇÃO

1. Periodonto

1.1. Anatomia do periodonto

O periodonto (do latim “peri”, que significa em redor e “odontos” que significa dente) é constituído pelo cemento, ligamento periodontal e osso alveolar, como se pode observar na Figura 1. A função primordial do periodonto é ligar o dente ao tecido ósseo, conferindo-lhe suporte e integridade assim como, defesa contra agentes externos (Lindhe et al., 2003). É de extrema importância reconhecer que cada um destes componentes periodontais tem uma estrutura muito especializada e que as suas características estruturais definem diretamente as suas funções. Assim, o funcionamento adequado do periodonto só será alcançado por meio da integridade estrutural e da interação entre os seus componentes (Nanci & Bosshardt, 2006).

O periodonto é uma unidade estrutural dinâmica que experiencia certas mudanças com a idade e em adição, sofre modificações morfológicas causadas por alterações funcionais e do meio oral, estando em constante desenvolvimento (Hassell, 1993; Lindhe et al., 2003).

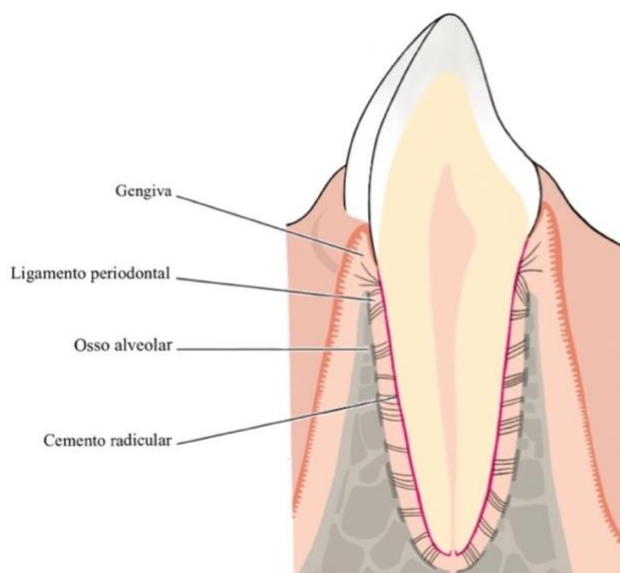


Figura 1- *Composição tecidual do periodonto.* (Adaptado de Lindhe et al., 2003).

1.1.1. Gengiva

A gengiva, representada na Figura 2, é a única relativamente aos tecidos referidos anteriormente, que é visível clinicamente na inspeção da cavidade oral (Hassell, 1993; Lindhe et al., 2003). É uma adaptação da mucosa oral que compreende componentes de

tecido epitelial e tecido conjuntivo, este último também designado de lâmina própria (Lindhe et al., 2003; Nanci & Bosshardt, 2006). O epitélio é dividido em três secções funcionais - gengival, sulcular e epitélio de união ou juncional. Por outro lado, o tecido conjuntivo é dividido em compartimentos superficial e profundo. O epitélio juncional desempenha um papel crucial, pois vai isolar os tecidos periodontais do ambiente oral. A sua integridade é essencial para a manutenção de um periodonto saudável. As patologias periodontais instalam-se quando a estrutura do epitélio juncional está debilitada (Nanci & Bosshardt, 2006). Os tecidos conjuntivos do periodonto são altamente vascularizados, facilitando a migração dos componentes moleculares e celulares do sangue para os tecidos periodontais. Assim, o fluido crevicular gengival (FCG) produzido pelo tecido conjuntivo, poderá atravessar o epitélio de união e ficar alojado no sulco gengival (Taylor & Preshaw, 2016).

Esta estrutura tecidular é relevante para este estudo, pois não só revela o estado de saúde oral macroscopicamente como permite recolher amostras relevantes de FCG presentes no sulco e ainda, confirmar o estado de saúde oral pela medição das dimensões do sulco gengival através de uma sonda periodontal, visível na Figura 3 (Lindhe et al., 2003; Taylor & Preshaw, 2016).

O FCG é um fluido fisiológico e um exsudado inflamatório que pode ser facilmente recolhido por meio de tiras de papel ou micropipetas (Barros et al., 2016; Ozmeric, 2004). A composição do FCG difere em termos de composição microbiana e de biomarcadores moleculares quando se comparam indivíduos com doença periodontal *versus* indivíduos periodontalmente saudáveis. Vários autores afirmam que, há mudanças claras na composição do FCG durante a progressão da doença e que certos mediadores podem ser usados para prever a sua evolução. Assim, a composição do FCG pode ser potencialmente usada para detetar alterações subclínicas no metabolismo e remodelação dos tecidos (Barros et al., 2016).

A maioria dos marcadores da doença periodontal são originados das células presentes no FCG. Os componentes celulares do FCG são 70 - 80% de granulócitos, 10 - 20% de monócitos/ macrófagos, 5% de mastócitos e 5% de linfócitos T (Ozmeric, 2004).

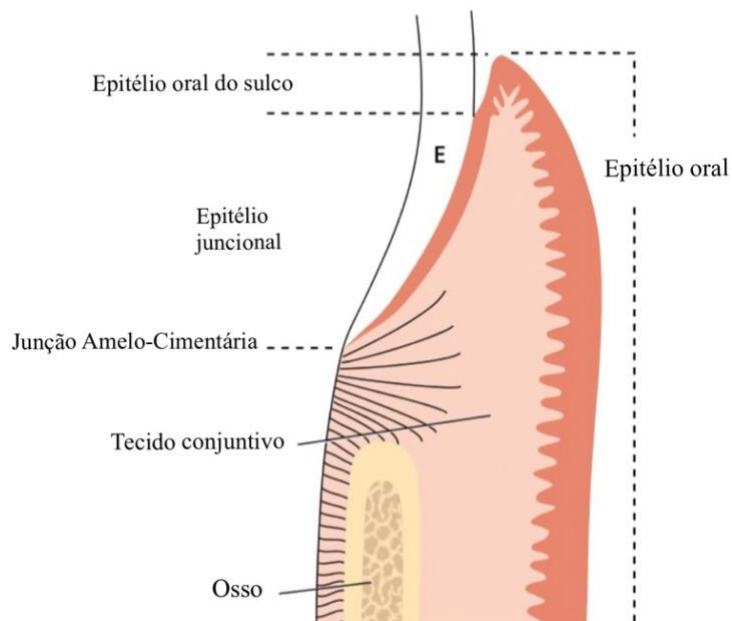


Figura 2- Corte histológico representativo da composição da gengiva e da área de contacto entre a gengiva e o esmalte (E). (Adaptado de Lindhe et al., 2003).

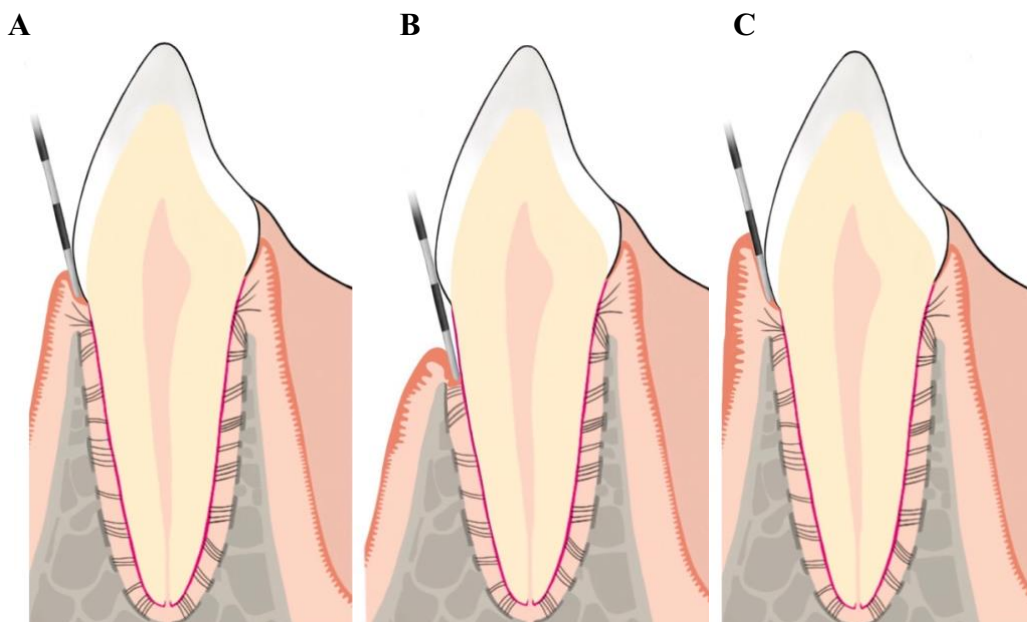


Figura 3- A: Medição das dimensões do sulco gengival através de uma sonda periodontal em saúde oral; B: Medição das dimensões do sulco gengival através de uma sonda periodontal na presença de recessão gengival; C: Medição das dimensões do sulco gengival através de uma sonda periodontal na presença de hiperplasia gengival. (Adaptado de Lindhe et al., 2003).

1.1.2. Ligamento periodontal

Entre o cimento que cobre a raiz e o osso do processo alveolar existe um espaço de 0,15 a 0,38 mm que é preenchido pelo ligamento periodontal (Hassell, 1993; Jiang et al., 2016; Nanci & Bosshardt, 2006). É um tecido conjuntivo laxo, celular e vascularizado que tem como principal função o suporte dos dentes e ao mesmo tempo permite-lhes

suportar forças de mastigação consideráveis. Adicionalmente, é um reservatório celular para a homeostase do tecido, permitindo a reparação ou regeneração tecidual (Lindhe et al., 2003; Nanci & Bosshardt, 2006).

O principal componente do ligamento periodontal é um arranjo sistemático de feixes de tecido fibroso denso, intimamente entrelaçado e flexível. Este conjunto, composto por fibras elásticas, fibras de Sharpey, fibras oxitalânicas, associadas a vasos sanguíneos e células, possuem disposições e orientações individualizadas, como é possível ver na Figura 4 (Hassell, 1993; Lindhe et al., 2003).

1.1.3. Cimento radicular

O cimento é um tecido avascular mineralizado e especializado, que cobre toda a superfície da raiz, formando uma interface entre a dentina radicular e o ligamento periodontal, representado na Figura 4. Ocasionalmente, também o podemos encontrar tanto na coroa dos dentes, em pequenas porções, como também se pode estender aos canais radiculares (Cho & Garant, 2000; Lindhe et al., 2003). Esta estrutura apresenta muitas semelhanças com o tecido ósseo no entanto, não contém vasos sanguíneos ou linfáticos, não tem inervação, não sofre reabsorção ou remodelação fisiológica mas é caracterizado por uma deposição contínua ao longo da vida (Lindhe et al., 2003). Comparativamente a outros tecidos mineralizados, apresenta uma matriz orgânica composta por fibras de colagénio e uma matriz inorgânica composta por 65% de hidroxiapatite (Lindhe et al., 2003; Nanci & Bosshardt, 2006). Tradicionalmente, é classificado pela ausência ou presença de células em cimento acelular e cimento celular, respetivamente (Cho & Garant, 2000).

O cimento tem várias funções, fornece ancoragem para os feixes das fibras de colagénio do ligamento periodontal, contribui para o processo de reparo após dano à superfície radicular e ainda, permite o ajuste da posição do dente a novas necessidades. Em suma, a área total da superfície da raiz coberta pelo cimento representa uma superfície disponível para a fixação do tecido conjuntivo (Lindhe et al., 2003).

1.1.4. Osso alveolar

Os processos alveolares representam extensões do corpo da mandíbula e da maxila e o seu desenvolvimento é contíguo ao desenvolvimento e erupção dos dentes (Hassell,

1993; Lindhe et al., 2003). O osso alveolar propriamente dito, representado na Figura 4, também chamado de osso fasciculado, reveste o alvéolo onde se vai alojar o dente, fornecendo fixação para os feixes de fibras do ligamento periodontal. Caso haja algum tipo de reabsorção deste osso esta é assíncrona, para que a inserção do ligamento periodontal seja apenas perdida localizadamente e por curtos períodos de tempo (Nanci & Bosshardt, 2006). O osso alveolar é constituído por dois tipos de osso, o compacto, que reveste as paredes dos alvéolos e o osso esponjoso que se encontra numa posição intermédia entre os alvéolos e o osso compacto (Lindhe et al., 2003).

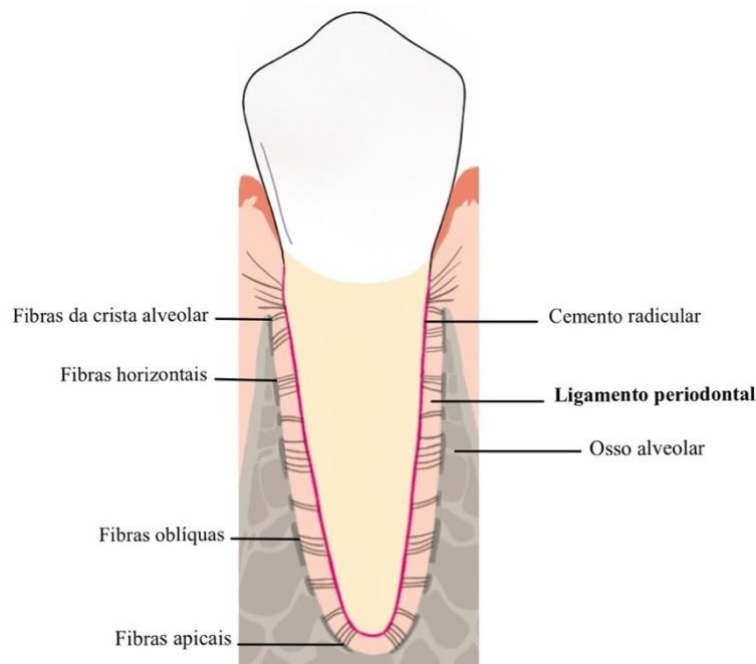


Figura 4- Ilustração da posição do ligamento periodontal entre o cimento radicular e o osso alveolar e representação das fibras do ligamento. (Adaptado de Lindhe et al., 2003).

2. Doença periodontal

2.1. Epidemiologia da doença periodontal

Ao longo dos anos foram realizadas estimativas da incidência e da prevalência da doença periodontal. Estas têm representado um dos principais desafios do estudo desta doença, devido à existência de diversos critérios diagnósticos e de métodos de avaliação e à falta de consenso no que diz respeito à definição e gravidade da doença periodontal. Assim, têm sido geradas estimativas incorretas e imprecisas do verdadeiro impacto global desta patologia (Carrizales-Sepúlveda et al., 2018; Kingman & Albandar, 2002). O conhecimento da prevalência, extensão e severidade da doença periodontal numa população é motivado por uma ampla gama de preocupações: descrição epidemiológica da distribuição e padrões da doença; interesses de pesquisa relacionados aos determinantes biológicos e ambientais da doença; quantificação e identificação de fatores

de risco presentes no início e na progressão da doença. Por conseguinte, o conhecimento da distribuição da doença periodontal pode reduzir o custo económico direto e indireto dos programas de prevenção e tratamento desta patologia (Kingman & Albandar, 2002).

2.1.1. Prevalência e incidência da doença periodontal em Portugal

Entende-se por prevalência o número de pessoas que estão doentes num exato momento ou no período de tempo da avaliação do quadro da população. Por sua vez, a incidência determina o número de novos casos que surgem numa população de risco num determinado intervalo de tempo (Fajardo-Gutiérrez, 2017).

Duas conclusões comuns aos vários estudos epidemiológicos são que, a prevalência e a severidade da doença periodontal aumentam com o envelhecimento e que os diferentes grupos populacionais são afetados de forma desproporcional por esta patologia. Com efeito, os estudos sugerem uma relação inversa entre o rendimento e a doença periodontal, sendo relatado que indivíduos com baixo rendimento tinham uma probabilidade 1,8 vezes maior de ter uma doença periodontal severa do que indivíduos de rendimento elevado (Borrell & Crawford, 2012; Carrizales-Sepúlveda et al., 2018).

Estudos epidemiológicos que usaram medidas da profundidade de sondagem e perda de inserção clínica mostraram que as formas avançadas de periodontite, que resultam numa perda severa das estruturas de suporte e perda dentária substancial afetam 10 - 15% da população global (Lindhe et al., 2003).

Para a avaliação da prevalência e incidência da doença periodontal em Portugal foram recolhidos dados da plataforma *Global Burden of Disease Results Tool* (GBD) do *Institute for Health Metrics and Evaluation* (IHME), que apresenta ferramentas que fornecem informações sobre a prevalência, incidência e gravidade da doença por idade, género, geografia e tempo. Os parâmetros de interesse selecionados na plataforma foram: base- singular; medida- prevalência e incidência; idade- todas as idades; ano- 1990, 2015 e 2019; causa- doenças periodontais; contexto- causas; localização- Europa Ocidental e Portugal; género- ambos; métrica- número e percentagem. Os resultados obtidos desta pesquisa estão apresentados nas Figuras 5 A - D.

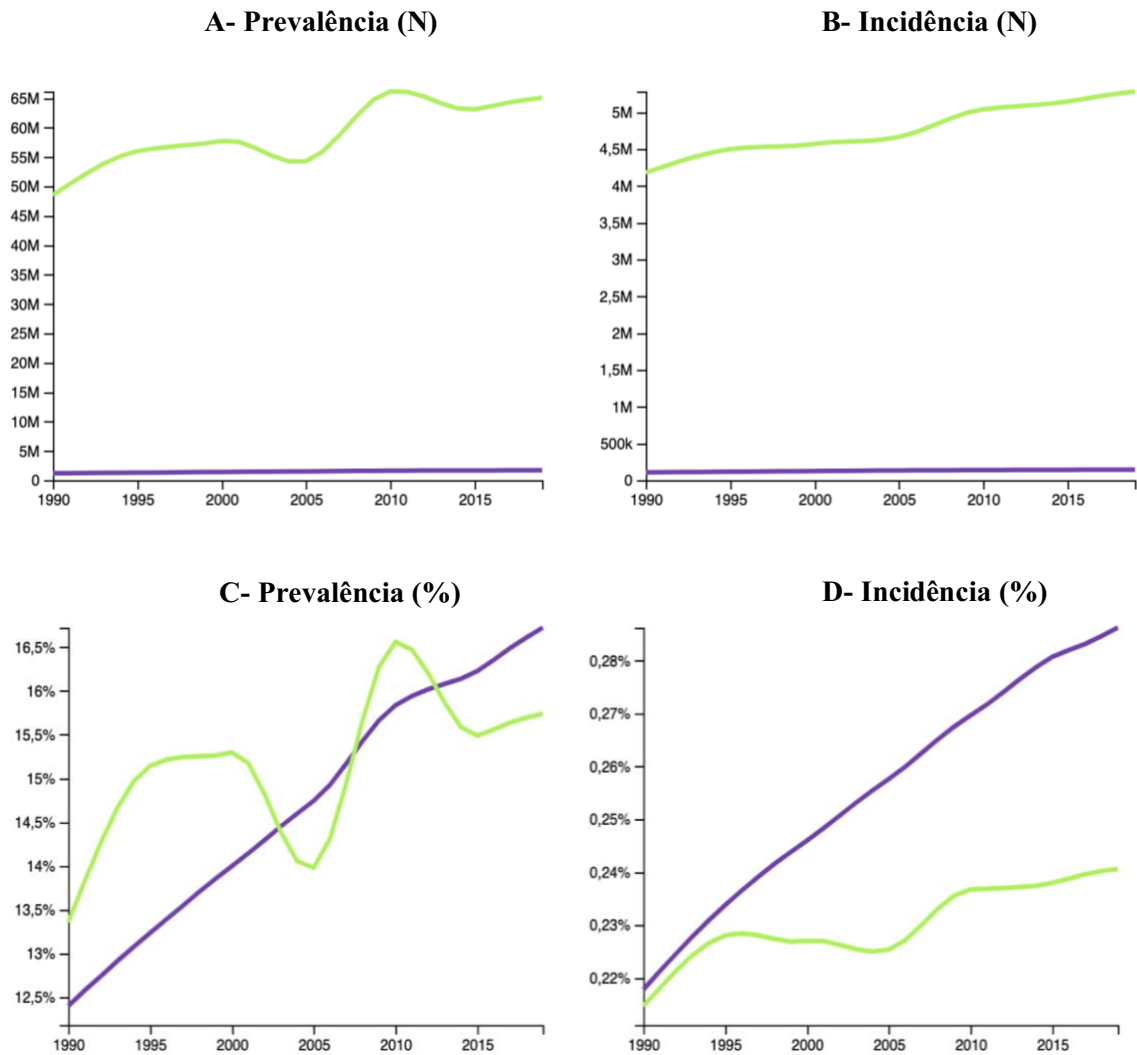


Figura 5- A e B: Representação numérica da prevalência e da incidência em Portugal de 1990 a 2019; C e D: Representação percentual da prevalência e da incidência em Portugal de 1990 a 2019. Linha verde- representação da evolução da doença periodontal na população da Europa Ocidental. Linha roxa- representação da evolução da doença periodontal na população portuguesa. (Adaptado do *Institute for Health Metrics and Evaluation [IHME]*, 2021).

Este estudo permite aferir que, a prevalência tanto em Portugal como na Europa Ocidental tem aumentado ao longo dos anos, tendo a Europa Ocidental períodos crescentes e decrescentes até 2019. Contudo, a incidência percentual demonstrou ser uma medida que alerta para o número de novos casos desta patologia em Portugal, sendo os seus valores superiores e acentuadamente crescentes comparativamente à Europa Ocidental, que aparenta um crescimento moderado com tendência a estabilizar. Em suma, este estudo veio comprovar que a incidência e prevalência desta patologia tem aumentado em Portugal. Aparenta assim, haver uma lacuna no que toca à sensibilização relativamente à doença periodontal e aos fatores de risco a ela associados (IHME, 2021; Kassebaum et al., 2017).

2.2. Fatores de risco da doença periodontal

Um fator de risco pode ser definido como uma característica que foi associada ao aumento da taxa de ocorrência de uma patologia. É importante salientar que os fatores de risco que estão associados a uma doença não a causam necessariamente. Os fatores de risco podem ser modificáveis ou não modificáveis. Os fatores de risco modificáveis são geralmente de natureza ambiental ou comportamental ao passo que, os fatores de risco não modificáveis são geralmente intrínsecos ao indivíduo e portanto, não são facilmente alteráveis (Nazir, 2017; Van Dyke & Dave, 2005).

No âmbito do presente trabalho, a fim de avaliar a possível influência de algum destes fatores, os participantes responderam a um questionário previamente à recolha das amostras. Os fatores de risco modificáveis considerados foram: o tabagismo; a toma de medicação; os hábitos alimentares e os fatores psicossociais. Os fatores de risco não modificáveis considerados foram: a idade; o género e as patologias sistémicas (Machado et al., 2020; Nazir, 2017; Van Dyke & Dave, 2005).

O tabagismo é um dos fatores de risco mais relevantes para a periodontite. Vários são os estudos que sugerem que fumar altera a flora oral microbiana ao aumentar o nível de certos microrganismos ou ao afetar a resposta do hospedeiro (Bergstrom, 2014; Nazir, 2017). Estudos transversais e de caso-controle demonstram que fumadores adultos têm aproximadamente três vezes mais probabilidade de ter periodontite do que os não fumadores. Os fumadores apresentam uma deficiente resposta à terapia periodontal e possuem aproximadamente metade da capacidade de melhoria das profundidades de sondagem e dos níveis de inserção clínica, após intervenções terapêuticas cirúrgicas e não cirúrgicas (Johnson & Hill, 2004). Estudos transversais e longitudinais concluíram que ex-fumadores (clinicamente definidos como dois ou mais anos desde que pararam de fumar) experienciaram menos perda de inserção do que os fumadores mas mais do que pessoas que nunca fumaram (Van Dyke & Dave, 2005).

Uma das patologias que influencia a doença periodontal é a diabetes mellitus. Esta patologia é um fator de risco modificável no sentido de que, embora não possa ser curada pode ser controlada. A periodontite e a diabetes são ambas patologias complexas, crónicas e com uma relação bidirecional estabelecida (Casanova et al., 2014; Van Dyke & Dave, 2005). O tratamento da doença periodontal foi associado a melhorias no controle

glicêmico em pacientes diabéticos, com reduções de hemoglobina glicada (HbA1c) de aproximadamente 0,4%. Por essas razões, o controle da periodontite em pessoas com diabetes é particularmente importante. Adicionalmente, o estudo de mediadores inflamatórios no FCG e na saliva é importante, pois os pacientes diabéticos com periodontite apresentam um nível elevado destes mediadores, comparativamente a indivíduos não diabéticos com doença periodontal (Casanova et al., 2014; Nazir, 2017).

Os fatores psicossociais considerados para este estudo foram: o *stress*; o cansaço físico e a ansiedade. O *stress* reduz o fluxo das secreções salivares o que, conseqüentemente irá aumentar a formação de placa bacteriana. Adicionalmente, indivíduos deprimidos demonstram ter uma concentração maior de cortisol no FCG e respondem pior ao tratamento periodontal (Nazir, 2017; Reners & Brex, 2007). A Figura 6 ilustra esquematicamente, a influência direta e indireta que o *stress* psicológico pode ter na doença periodontal.

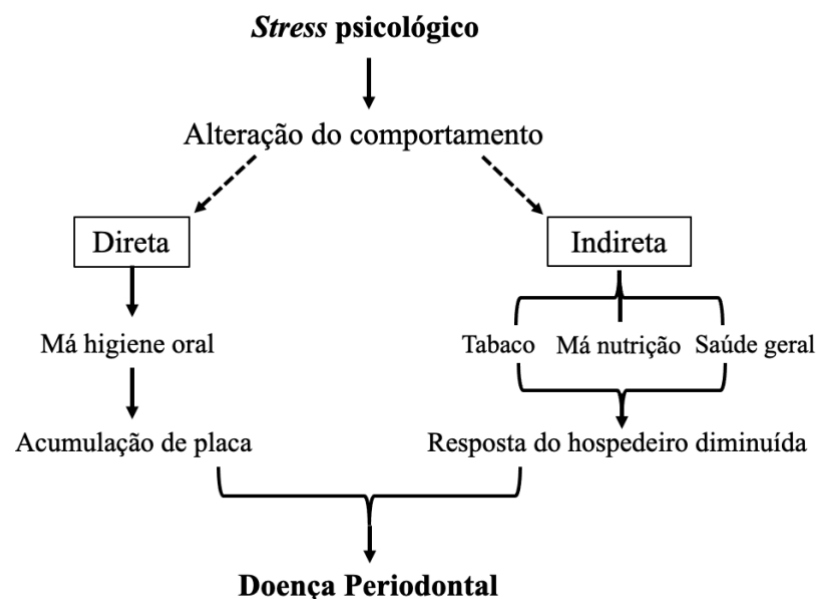


Figura 6- Representação esquemática da influência do *stress* psicológico na doença periodontal. (Adaptado de Reners & Brex, 2007).

Determinados medicamentos podem ter efeitos secundários ao nível do periodonto, sendo a hiperplasia gengival um dos exemplos mais comuns. A medicação pode ainda, modificar as respostas inflamatórias e imunológicas dos tecidos periodontais à placa bacteriana assim como, levar a uma diminuição do fluxo salivar e conseqüentemente a uma sensação de boca seca, denominada de xerostomia. Esta redução de saliva, leva a um aumento da vulnerabilidade dos pacientes a infecções e doenças

periodontais assim como, a um aumento da incidência de cáries (Albandar, 2002; Konttinen et al., 1997; Seymour, 2006; Wanchu, 2000). Os três medicamentos mais relacionados com a hiperplasia gengival são: anticonvulsivantes; a ciclosporina e os bloqueadores dos canais de cálcio (Seymour, 2006).

A idade encontra-se no grupo de fatores de risco não modificáveis. Estudos epidemiológicos demonstraram que, com o passar do tempo há um evidente aumento da prevalência, extensão e gravidade da perda de inserção periodontal levando assim, a um aumento do risco de doença periodontal com o aumento da idade (Albandar, 2002; Nazir, 2017). Rhee et al. (2011), na Coreia, realizou um estudo coorte com 2.529 indivíduos com o objetivo de avaliar quais as variáveis relacionadas com a perda de inserção clínica em adultos coreanos com mais de 40 anos de idade. No final do estudo, os autores concluíram que a idade avançada, o sexo masculino e o tabagismo foram fatores de risco significativos para o aumento de perda de inserção clínica e podem ser indicadores essenciais de grupos de alto risco de periodontite. Assim, este estudo foi concordante com outros autores ao afirmar que, indivíduos que têm entre 50 e 60 anos têm maior risco de doença periodontal comparativamente a indivíduos com menos de 50 anos. No entanto, há autores que consideram que o aumento do nível de destruição periodontal, observado com o envelhecimento, é o resultado da destruição cumulativa e não o resultado de taxas aumentadas de destruição, ou seja, a idade isoladamente não foi considerada um fator de risco (Van Dyke & Dave, 2005).

O género, como referido anteriormente por Rhee et al. (2011), também se define como um fator de risco da doença periodontal. Os estudos já realizados não foram concordantes em relação à influência deste fator. Alguns estudos evidenciaram que, as doenças periodontais e a perda de tecido periodontal parecem estar mais prevalentes em homens do que em mulheres e que existe uma maior prevalência da profundidade de sondagem de ≥ 4 mm em homens (Albandar, 2002).

2.3. Classificação da doença periodontal

Desde a descrição inicial da doença periodontal, a classificação desta doença tem sofrido várias alterações ao longo do tempo. Na classificação de 1999, a periodontite era classificada em duas categorias, a “agressiva” e a “crónica”. Contudo, as publicações posteriores destacaram deficiências nas definições propostas (Fine et al., 2018).

Atualmente, a nova forma de classificação da doença periodontal, apresentada em 2018, agrupa os termos anteriormente apresentados numa única categoria, "periodontite", sendo esta posteriormente caracterizada com base na extensão e severidade (estadio da doença) e taxa de progressão (grau da doença) (Caton et al., 2018; Papapanou et al., 2018; Steffens & Marcantonio, 2018).

A classificação do estadio apresentada na Tabela 1, está intimamente dependente da severidade da doença periodontal aquando da sua apresentação, bem como da complexidade do tratamento da doença (Papapanou et al., 2018). O estadio deve ser primariamente definido pela perda clínica de inserção, denominada como uma “característica determinante”. Na sua ausência, deve-se recorrer à perda óssea determinada radiograficamente. Adicionalmente a estes dois fatores, a contagem de dentes perdidos devido à doença periodontal completa a avaliação da severidade da periodontite. No caso de haver “fatores de complexidade”, como lesões de furca ou mobilidades avançadas, deve-se subir o estadio atribuído inicialmente. Adicionalmente, a periodontite pode ser classificada quanto à sua extensão e distribuição em “localizada” ou “generalizada” ou ainda, “padrão molar/ incisivos” (Caton et al., 2018; Fine et al., 2018; Papapanou et al., 2018; Steffens & Marcantonio, 2018).

Por sua vez, o grau representado na Tabela 2, é utilizado como um indicador da taxa de progressão da periodontite, bem como possíveis efeitos na saúde sistémica (Caton et al., 2018; Papapanou et al., 2018; Steffens & Marcantonio, 2018). Os critérios primários são constituídos por evidências diretas ou indiretas da progressão da doença. Sempre que disponível, a evidência direta deverá ser usada contudo, na sua ausência a estimativa indireta é feita ao usar a percentagem de perda óssea no dente mais afetado em função da idade do paciente (Papapanou et al., 2018). Os pacientes que apresentam periodontite são inicialmente, considerados pacientes de grau B. Todavia, os fatores apresentados anteriormente e os fatores de risco ditos “modificadores de grau”, poderão alterar esta classificação (Papapanou et al., 2018; Steffens & Marcantonio, 2018).

Tabela 1- Classificação da periodontite com base no estadio. (Adaptado de Steffens & Marcantonio, 2018).

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

Tabela 2- Classificação da periodontite com base no grau. (Adaptado de Steffens & Marcantonio, 2018).

Grau de Periodontite			Grau A	Grau B	Grau C
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 mellitus	Normoglicémico	HbA1c < 7% em diabéticos	HbA1c ≥ 7% em diabéticos

3. Óxido nítrico

3.1. Papel fisiológico (patofisiológico) do NO

O óxido nítrico é um químico que na atmosfera é nocivo, mas em pequenas concentrações controladas no corpo, atua como um mediador fisiológico e fisiopatológico, desempenhando um papel importante nos sistemas biológicos (Sundar et al., 2013). O NO é indicado como um importante regulador do fluxo sanguíneo, da neurotransmissão, do funcionamento normal do sistema genito-urinário e da resposta à inflamação e defesa do hospedeiro (Oliveira-Paula & Tanus-Santos, 2019).

Contudo, o aumento excessivo das concentrações de NO ou de espécies reativas de nitrogénio resulta no chamado *stress* nitrosativo o qual, pode resultar em danos nas estruturas celulares incluindo lípidos, membranas, proteínas e ADN (Karwowska & Kononiuk, 2020).

3.2. Biossíntese do NO

3.2.1. Via clássica L-arginina – NO-sintase

Durante algum tempo, pensou-se que a formação do óxido nítrico teria origem exclusiva pela via clássica da L-arginina – NO-sintase ou via L-arginina – NOS, uma via dependente do oxigénio. Porém, atualmente, sabe-se que o nitrato (NO_3^-) e o nitrito (NO_2^-), produtos inertes desta mesma via, podem ser reciclados por redução *in vivo* para formar NO, representando uma importante fonte alternativa à via clássica, em particular em estados hipóxicos (Ghalayini, 2004; Karwowska & Kononiuk, 2020; Lundberg et al., 2008; Timby et al., 2020).

Na via L-arginina – NO-sintase, representada nas Figuras 7 a 9, o NO é formado nas células endoteliais em situações de normóxia, onde o aminoácido L-arginina e o oxigénio são utilizados na formação de L-citrulina e libertação de NO, numa reação de oxidação catalisada por óxido nítrico sintases específicas (NOS). Esta reação tem como co-substratos o oxigénio molecular e o dinucleótido de nicotinamida adenina (NADPH) na sua forma reduzida e fosfatada (Ghalayini, 2004; Karwowska & Kononiuk, 2020; Timby et al., 2020).

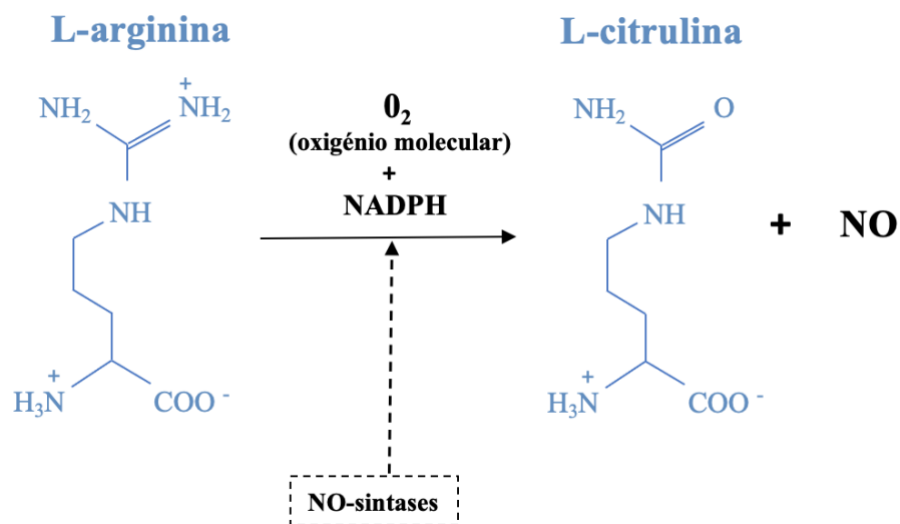


Figura 7- Formação do NO em normóxia (via clássica). (Adaptado de Ghalayini, 2004).

As NOS existem em três isoformas distintas, NOS endotelial (eNOS), NOS neural (nNOS) e NOS induzível (iNOS). A eNOS e a nNOS libertam pequenas quantidades de NO, por um curto período de tempo após a estimulação dos seus recetores. Em contraste, a iNOS é estimulada em resposta a estímulos pró-inflamatórios e produz grandes

quantidades de NO, por um prolongado período de tempo (Sundar et al., 2013; Wang et al., 2019). A expressão e os níveis de produção de iNOS estão marcadamente aumentados após uma lesão e inflamação, quando as células são ativadas por estímulos externos. Esta isoenzima está frequentemente relacionada com o desenvolvimento da doença periodontal (Lohinai & Szabó, 1998; Lundberg et al., 2008; Wang et al., 2019).

3.2.2. Via nitrato - nitrito - NO

A Figura 8 esquematiza a relação entre a via clássica de síntese de NO e a via alternativa, via nitrato - nitrito - NO, que é ativada em condições de hipóxia. A formação suficiente de NO é garantida ao longo dos gradientes fisiológicos e patológicos de oxigénio e prótons pela ação paralela de ambas as vias (Lundberg et al., 2008).



Figura 8- Equilíbrio de formação de NO pela via clássica e pela via nitrato - nitrito - NO. (Adaptado de Lundberg et al., 2008).

Na via nitrato – nitrito - NO, os aniões inorgânicos nitrato e nitrito são reduzidos para formar NO no sangue e nos tecidos durante a hipóxia fisiológica (Lundberg et al., 2008). Assim, o nitrito servirá como uma forma suplementar de formação de NO em condições específicas de ausência de oxigénio e isquémica, mas também em determinadas condições fisiológicas (Karwowska & Kononiuk, 2020). Primeiramente, os nitratos transportados através de proteínas membranares, da dieta e da saliva, são parcialmente reduzidos em nitritos através de bactérias anaeróbias encontradas na cavidade oral (Karwowska & Kononiuk, 2020; Lundberg et al., 2008; Qu et al., 2016). A desoxihemoglobina é a enzima redutora do nitrito, levando à formação de NO. Quando

esta está a 40 - 60% saturada em oxigénio, num pH 6,4, há formação de NO a partir do nitrito a uma taxa máxima (Lundberg et al., 2008; Zhao et al., 2015).

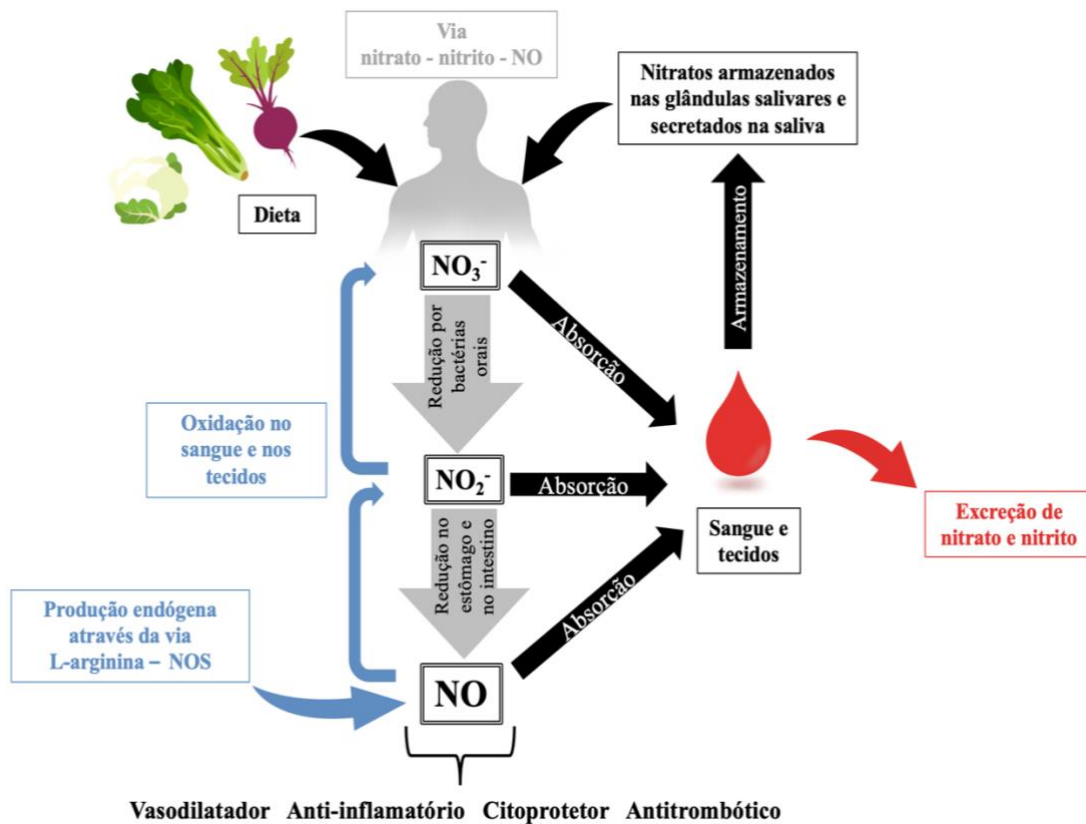


Figura 9- Esquematização do metabolismo de nitrato, nitrito e NO, composto pela via L-arginina – NO- sintase e pela via nitrato - nitrito - NO. (Adaptado de Karwowska & Kononiuk, 2020).

Estudos pré-clínicos demonstraram que a redução de nitrito em NO resulta numa série de efeitos benéficos, incluindo a vasodilatação dos vasos sanguíneos e redução da pressão arterial, bem como efeitos citoprotetores que limitam a extensão do dano causado por isquémia/ reperfusão (Oliveira-Paula & Tanus-Santos, 2019; Sundar et al., 2013; Zhao et al., 2015).

3.3. Visão integrada do NO e outros óxidos de azoto

3.3.1. Aplicações clínicas do nitrito

O efeito positivo dos nitratos e nitritos na terapêutica humana está relacionado com o facto de os mesmos funcionarem como dadores exógenos para formação de NO, tal como explicado anteriormente. A vantagem mais amplamente descrita da ingestão de nitrato e nitrito é o efeito benéfico que os mesmos têm no sistema cardiovascular (Karwowska & Kononiuk, 2020; Lundberg et al., 2008). Ashworth et al. (2015), realizou

um estudo onde os resultados indicaram que o consumo de duas porções de vegetais com alto teor de nitrato, diariamente e por sete dias, resultou numa redução da pressão arterial sistólica de aproximadamente 4 - 5 mmHg em mulheres normotensas. Adicionalmente, os autores sugeriram que, no caso de pessoas com hipertensão arterial poderá ser alcançada uma maior redução da pressão arterial.

Nas últimas duas décadas, tem aumentado exponencialmente o número de estudos sobre os benefícios do consumo de alimentos ricos em nitrato e nitrito. Estes demonstraram proteger o coração de lesões causadas por ataques cardíacos, suprimir a inflamação microvascular, prevenir lesões renais por hipertensão arterial, reverter a disfunção endotelial vascular e melhorar consideravelmente a tolerância à glicose e à insulina (Bryan, 2016; Karwowska & Kononiuk, 2020; Lundberg et al., 2008; Ma et al., 2018). Os resultados obtidos por Zand et al. (2011), confirmaram uma redução dos triglicéridos (TG) em cerca de 72% em pacientes com níveis de triglicéridos superiores a 150 mg/dL, após 30 dias de suplementação com produtos de alto teor em nitrato e nitrito.

Em suma, sabendo que ao baixar a pressão arterial em apenas 5 mmHg se reduz o risco de acidente vascular cerebral (AVC) em 35% e o risco de doença isquémica do coração em 21% (as duas principais causas de morte no mundo), é importante analisar a relação risco/ benefício da utilização destes aniões, reconhecendo a sua importância e implementando intervenções dietéticas (Bryan, 2016).

3.3.2. Concentrações de nitrito, dieta e bactérias comensais orais

Bryan (2016) verificou que há uma relação linear entre as quantidades de nitrato ingeridas e as quantidades de nitrato e nitrito encontradas na saliva e que a idade influencia as concentrações de nitrito, pois a média de nitrito salivar aumenta de 21,7 μ M em bebês de 6 meses para cerca de 152,2 μ M ou mais em adultos. Esse estudo, permitiu ainda, verificar que a capacidade individual da microflora oral de reduzir nitrato a nitrito, depende da comunidade das bactérias comensais orais e que níveis superiores a 10,9 mM de nitrito salivar podem ser atingidos após a ingestão de alimentos ricos em nitratos. Os alimentos que têm concentrações consideradas elevadas de nitratos (0,9 - 39,5mg/100mg) e que influenciam as quantidades de nitrito são: as carnes processadas como o fiambre, o bacon e as salchichas; vegetais de folha verde como o aipo, o agrião, a alface, a beterraba, o espinafre e a rúcula e frutas como a banana e a

laranja, os quais deverão ser considerados no momento da análise do nitrito. (Allaker et al., 2001; Ashworth et al., 2015; Bryan, 2016; Christiansen et al., 1973; Hord et al., 2009; Ma et al., 2018). Aproximadamente 5 - 7% dos nitratos dietéticos e 20% dos nitratos salivares são reduzidos a nitritos na cavidade oral por bactérias comensais sendo que, a *Neisseria*, *Porphyromonas*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Brevibacillus* e *Granulicatella* estão indicadas como as principais envolvidas neste processo. Estas bactérias vão permitir a redução do nitrato dietético através da ação catalisadora das enzimas nitrato redutase (NORs). Este processo ocorre por meio da utilização do nitrato como recetor de eletrões em condições anaeróbias (Bryan, 2016; Doel et al., 2005; Hyde et al., 2014; Karwowska & Kononiuk, 2020). O nitrato, após ser absorvido no trato gastrointestinal superior chega às glândulas salivares pela circulação sanguínea, onde é secretado na cavidade oral e parcialmente reduzido a nitrito pela microflora oral. Esta redução pode ser aumentada ou reduzida face a fatores como, a dieta do indivíduo, a idade e presença de patologias (Karwowska & Kononiuk, 2020; Lundberg et al., 2008; Oliveira-Paula & Tanus-Santos, 2019).

Os níveis circulantes de nitrito são derivados de duas fontes principais, o metabolismo oxidativo do NO endógeno e a dieta. No entanto, existem fatores externos e internos que alteram as concentrações de nitrito (Kapil et al., 2018; Lundberg et al., 2008; Oliveira-Paula & Tanus-Santos, 2019). A Tabela 3 apresenta as concentrações médias deste anião na cavidade oral em condições normais e as variações relacionadas com situações de doença periodontal, administração de nitrato e género. Estes valores permitem aferir que, independentemente da unidade de medida escolhida pelos autores, existem variáveis que alteram as concentrações de nitrito na saliva e no FCG, pois enquanto a exposição ao nitrato é principalmente exógena, a exposição ao nitrito é principalmente endógena, dependente do metabolismo do nitrato (Lundberg et al., 2008).

Tabela 3- *Concentrações de nitrito na saliva e no fluido crevicular gengival em diferentes condições.*

	Concentrações de nitrito na saliva	Concentrações de nitrito FCG	Variações nas concentrações de nitrito	
(Bryan, 2016)	43,48 μ M	_____	Em jejum: 41,30 μ M	Após administração 4.6 mg/kg de nitrato: 2173,91 μ M
(Han et al., 2013)	316,06 \pm 43,51 μ M (ANOVA, p = 0.015)	_____	Periodontite leve: 228,57 \pm 44,7 μ M (ANOVA, p = 0.015)	Periodontite moderada: 233,21 \pm 71,19 μ M (ANOVA, p = 0.015) Periodontite agressiva: 524,85 \pm 83,46 μ M (ANOVA, p = 0.015)
(Topcu et al., 2014)	8,67 \pm 8,68 μ M (p>0.05) (Dunn)	0,83 \pm 0,31 nmol (p> 0.05) em 0,32 \pm 0,17 μ L (Dunn)	Gengivite (saliva): 5,56 \pm 4,53 μ M (P > 0.05) (Dunn)	Periodontite (saliva): 5,55 \pm 5,39 μ M (P > 0.05) (Dunn)
			Gengivite (FCG): 1,07 \pm 0,62 nmol (p> 0.05) em 0,64 \pm 0,43 μ L (Dunn)	Periodontite (FCG): 1,08 \pm 0,59 nmol (p> 0.05) em 1,23 \pm 0,6 μ L (Dunn)
(Sánchez et al., 2014)	Saliva não estimulada: \approx 320 μ M (ANOVA, p< 0.001)	_____	Saliva não estimulada+ periodontite + antes de tratamento periodontal: \approx 500 μ M (ANOVA, p< 0.001)	Saliva não estimulada+ periodontite + depois de tratamento periodontal: \approx 450 μ M (ANOVA, p< 0.001)
(McKnight et al., 1997)	53,9 \pm 22.8 μ M (ANOVA, p< 0.001)	_____	Após administração 2 mmol de nitrato: 761,5 \pm 187,7 μ M (ANOVA, p< 0.001)	
(Scarel-Caminaga et al., 2017)	0,03678 \pm 0,03913 μ M (Shapiro-Wilk, p=0.009)	_____	Periodontite crônica: 0,03041 \pm 0,03568 μ M (Shapiro-Wilk, p=0.009)	
(Kapil et al., 2018)	_____	_____	Sexo feminino: \approx 230 μ M (Student's t-test, p=0.012)	Sexo masculino: \approx 120 μ M (Student's t-test p=0.012)
(Aurer et al., 2001)	22,4 \pm 17,04 μ M (Student's t-test, p<0.001)	_____	Periodontite adulta: 11,1 \pm 8.23 μ M (Student's t-test, p<0.001)	Periodontite com progressão rápida 2.5 \pm 3,27 μ M. (Student's t-test, p<0.001)

Nota: Os valores foram recalculados por questões de uniformização das unidades de concentração.

3.4. Doença periodontal e o NO

Embora existam dados limitados sobre os efeitos benéficos diretos do aumento das concentrações de nitrito em patologias orais, como a periodontite, há uma abundância de estudos pré-clínicos e clínicos que demonstram que a eficácia da gestão entre a deficiência e a suplementação dietética de NO ajuda no retardamento da progressão da doença periodontal (Bryan, 2016; Sundar et al., 2013).

A evidência científica mostra que, as concentrações de NO aumentam com a progressão da periodontite (Sundar et al., 2013; Wang et al., 2019). O NO ativa enzimas pró-inflamatórias, como a ciclooxigenase e as metaloproteinases que, por sua vez, contribuem para o dano do tecido periodontal (Menaka et al., 2009). A atividade e expressão das isoformas das NOS está aumentada no tecido gengival de pacientes com gengivite ou periodontite crónica, induzindo um aumento na produção de NO (Menaka et al., 2009; Sánchez et al., 2014). Na periodontite, a expressão de iNOS desempenha não só um papel prejudicial, como também benéfico. Os efeitos prejudiciais podem incluir uma ação citotóxica para os tecidos do hospedeiro, incluindo danos ao osso alveolar. Contrariamente, os efeitos benéficos podem incluir a atividade antimicrobiana, modulação imunológica, inibição da trombose microvascular, bem como um aumento da perfusão tecidual (Lohinai & Szabó, 1998; Menaka et al., 2009).

Assim, as propriedades pró ou anti-inflamatórias variam consoante a concentração do NO, o potencial de formação de derivados tóxicos, o local do processo patológico e a resposta adaptativa da célula-alvo (Menaka et al., 2009).

Relativamente ao nitrito, Allaker et al. (2001), afirma que este em condições ácidas, tem um efeito inibitório nas bactérias cariogénicas tolerantes a ácidos *in vitro* e salienta a possibilidade de que este metabolito, em condições apropriadas, iniba esses microrganismos *in vivo*. Ou seja, um aumento no nitrato proveniente da dieta e um aumento subsequente do nitrito salivar poderão contribuir para um efeito protetor contra as condições que afetam os tecidos orais duros e moles e assim, apresentar uma barreira para infeções periodontais e outras infeções orais.

Por sua vez, Han et al. (2013), avaliou a associação entre periodontite e os metabolitos do óxido nítrico salivar na comunidade Coreana e afirmou que existe uma

relação entre a presença da periodontite e os metabólitos do NO, bem como uma associação significativa entre a periodontite grave e os níveis de nitrito. Contudo, não houve uma associação significativa entre a extensão da periodontite e o nitrito. Estudos adicionais serão necessários para esclarecer o mecanismo dessa associação. Da mesma forma, Topcu et al. (2014), concluiu que os níveis de nitrato não diferiram significativamente entre os grupos de estudo com diferentes níveis de gravidade da doença periodontal. Contudo, este autor afirma que há uma diminuição gradual da razão nitrato/ nitrito com a presença de inflamação.

3.4.1. Biomarcadores da doença periodontal

Entende-se por biomarcadores todas as substâncias que sejam objetivamente medidas e avaliadas como indicadores dos processos biológicos normais e processos patogênicos, ou as respostas a uma intervenção terapêutica (Sundar et al., 2013).

Os biomarcadores da doença periodontal desempenham um papel importante para o diagnóstico, avaliação dos resultados e personalização da terapêutica (Lundberg et al., 2008; Topcu et al., 2014). Estes marcadores bioquímicos e imunológicos presentes na saliva ou no FCG, podem determinar parcialmente a extensão da doença periodontal e até mesmo prever a sua progressão (Reher et al., 2007). A análise destes fluidos é especialmente benéfica na determinação do estado periodontal no momento da recolha. São vários os estudos que indicam que a determinação dos níveis de mediadores inflamatórios em fluidos biológicos é um bom indicador de atividade inflamatória (Allaker et al., 2001; Ozmeric, 2004). Alguns dos biomarcadores mais frequentemente associados à doença periodontal são: o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6), sendo o NO já considerado um biomarcador por alguns autores (Allaker et al., 2001; Fine et al., 2018; Kharaeva et al., 2016; Ozmeric, 2004; Scarel-Caminaga et al., 2017).

Nos últimos anos, estudos sobre o envolvimento do NO e do *stress* nitrosativo na periodontite crónica, têm enfatizado a necessidade de melhorar os parâmetros de diagnóstico e a importância que se deve dar aos biomarcadores desta doença (Topcu et al., 2014). Já a avaliação das concentrações de nitrito e nitrato que são produzidas pelos eventos bioquímicos na resposta imunológica durante a interação patógeno-hospedeiro, tem um papel importante na compreensão da etiopatogenia da doença periodontal,

apoiando a possibilidade destes metabolitos funcionarem como biomarcadores desta patologia (Han et al., 2013; Oliveira-Paula & Tanus-Santos, 2019; Topcu et al., 2014).

3.5. Medição do nitrito

O NO é um radical livre diatómico extremamente instável e solúvel que se pode difundir rapidamente através de vários biofilmes (Topcu et al., 2014; Wang et al., 2019). Esta instabilidade na presença de oxigénio faz com que este radical sofra um processo de oxidação para produzir óxidos de nitrogénio mais estáveis, nitrito e nitrato. Devido a esta reatividade e consequentemente a um tempo de semi-vida muito curto (< 5s), as medições diretas de NO nas células e tecidos são muito difíceis. Contudo, os metabolitos estáveis do NO permitem a sua medição indireta. Deste modo, os níveis totais de nitrito e nitrato em fluidos biológicos são utilizados para a monitorização da síntese de NO (Timby et al., 2020; Topcu et al., 2014; Wang et al., 2019). A medição das concentrações de nitrito tem sido feita a partir da recolha de vários fluidos corporais e através de variados métodos. Os fluidos mais utilizados para fazer a medição deste metabolito são: saliva; FCG; urina e sangue (Bryan, 2016; Kapil et al., 2018; Ma et al., 2018).

Alguns dos métodos de análise de nitrito são: o teste imunoenzimático- método ELISA (Bejeh-Mir et al., 2014); dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel- (μ PAD) (Bhakta et al., 2014); tiras de papel reagente (Ramenzoni et al., 2021); coloração imuno-histoquímica (Wang et al., 2019); sendo o método colorimétrico de Griess o mais comum (Han et al., 2013; Lohinai & Szabó, 1998; Parwani et al., 2012; Ramos et al., 2006; Reher et al., 2007; Topcu et al., 2014).

A reação de Griess, representada na Figura 10, associada a medições espectrofotométricas, foi a base da técnica colorimétrica de diagnóstico utilizada neste estudo. Esta reação de diazotização usa a sulfanilamida (SA), uma amina aromática e o N-(1-naftil)-etilenodiamina (NED/NEDA) como reagente acoplador (Ramos et al., 2006; Tsikas, 2007).

Como produto de reação, em meio ácido, forma-se um composto diazo de coloração rosa que absorve radiação visível na ordem dos 540 nm. É de extrema importância adicionar os reagentes na correta sequência, ou seja, primeiro o SA e depois o NEDA. Após a adição destes reagentes, todos incolores, deve-se esperar 10 minutos

para que se desenvolva coloração (Ramos et al., 2006; Tsikas, 2007; Vishwakarma et al., 2019).

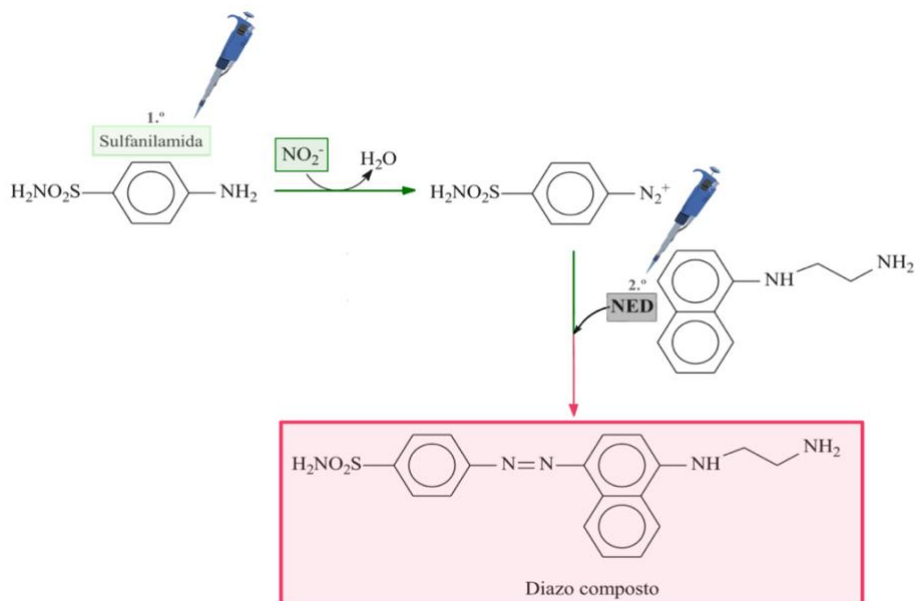


Figura 10- Reações químicas envolvidas na quantificação de nitrito (NO_2^-) através da reação de Griess. (Adaptado de Vishwakarma et al., 2019).

3.5.1. Recolha de fluidos orais para a medição de biomarcadores da doença periodontal

Fluidos orais, como o FCG e a saliva, são facilmente recolhidos e podem servir de base para uma avaliação de biomarcadores específicos do paciente para a periodontite e doenças sistêmicas (Sundar et al., 2013).

A saliva, um fluido oral multiconstituinte que tem um alto potencial para a vigilância da saúde e doença em geral, é considerada um fluido de extrema importância na área da medicina dentária e no campo da fisiologia oral, devido ao seu potencial uso como ferramenta diagnóstica não invasiva. Ao longo dos anos, a saliva tem sido usada para detectar e diagnosticar várias doenças como, doenças autoimunes, doenças cardiovasculares, cáries dentárias e outras patologias orais (Bhattarai et al., 2018; Lee & Wong, 2009). A sua utilização apresenta várias vantagens como, a facilidade de uso, o método de recolha não-invasivo e um custo-benefício adequado (Bhattarai et al., 2018; Javaid et al., 2016; Topcu et al., 2014).

4. Hipóteses

As hipóteses consideradas para este estudo são:

- O nitrito é um mediador inflamatório da doença periodontal;
- O aumento do nitrito na saliva e no FCG é proporcional ao aumento do estadio e grau da doença periodontal;
- Fatores de risco como o tabagismo, medicação, patologias sistémicas entre outros, alteram as quantidades de nitrito nos fluidos orais.

5. Objetivos

- Implementar um protocolo de análise de nitritos em amostras de saliva e de FCG;
- Comparar os níveis de concentração de nitrito na saliva e no FCG em pacientes com doença periodontal e pacientes periodontalmente saudáveis;
- Avaliar a possível correlação entre os níveis de nitrito e os diferentes estadios e graus da periodontite.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Considerações éticas

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética Egas Moniz (processo interno nº 929 de 2021). Todos os participantes assinaram um consentimento informado após lhes ter sido explicado os objetivos do estudo, que a sua participação era voluntária e anónima e que os dados seriam utilizados exclusivamente para a análise estatística.

2. Materiais e reagentes utilizados

2.1. Materiais para recolha das amostras

Para a recolha de saliva foram utilizados os kits de recolha de amostras de saliva da *Salimetrics®*, compostos por *Saliva Collection Aid* (SCA) e frascos de colheita (*cryovials*) (figura 11).



Figura 11- A: Auxiliar de recolha da saliva (SCA); B: Frasco de colheita/ criogénico (*cryovials*); C: Composição do kit de recolha de amostras de saliva da *Salimetrics®*.

Para a recolha de FCG foram utilizadas tiras de papel absorvente *PerioPaper®* *Gingival Fluid Collection Strips* com capacidade de absorver 0 a 1,2 µl de fluido (figura 12), rolos de algodão, *dry-tips®*, *sani-tip®* e micropipetas *Microcapillary tube Drummond Microcaps®* de 50 µl (figura 13).



Figura 12- Tiras de papel *PerioPaper®* *Gingival Fluid Collection Strips*.

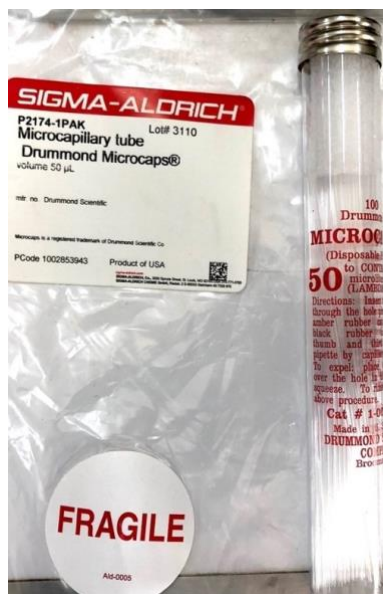


Figura 13- Micropipetas Microcapillary tube Drummond Microcaps®.

2.2. Reagentes

Os reagentes utilizados na preparação das soluções aquosas, usadas no método de Griess, foram os seguintes: nitrito de sódio, da *AnalaR NORMAPUR®* ($\geq 99\%$); hidróxido de sódio, da *Sigma-Aldrich®* ($\geq 98\%$); sulfanilamida (SA), da *Sigma-Aldrich®* ($\geq 98\%$); ácido clorídrico, da *Sigma-Aldrich®*, ($\geq 37\%$); N-(1-naftil)-etilenodiamina (NED/NEDA), da *Sigma-Aldrich®* ($\geq 98\%$) e água destilada.

2.3. Equipamentos

Os reagentes sólidos foram pesados numa balança digital *H03D series lbxinstruments®*. A determinação do volume de amostra nas tiras de papel foi efetuada no instrumento *Periotron® Model 8010*. As análises espectrofotométricas (UV-Visível) foram efetuadas num espectrofotómetro *Jasco® Model V-530* e a centrifugação das amostras foi realizada na centrífuga *Eppendorf® Minispin®*.

3. Estudo clínico

3.1. Seleção da amostra

A amostra, selecionada por conveniência, foi constituída no total por 27 utentes da Clínica Universitária Egas Moniz (13 pacientes com saúde periodontal e 14 com periodontite). O horário da recolha foi entre as 8h até às 11h30 para minimizar a interferência da dieta nas concentrações de nitrito observadas.

3.2. Critérios de inclusão e critérios de exclusão

Para que os pacientes pudessem participar no estudo tinham de reunir os seguintes requisitos:

- Idade igual ou superior a 18 anos;
- Pelo menos 10 dentes presentes;
- Assinatura do consentimento informado.

Os critérios de inclusão considerados específicos para cada grupo da amostra:

Grupo A- pacientes periodontalmente saudáveis:

- Exploração clínica: gengiva com coloração rosa-clara e sem hemorragia à sondagem;
- Se indicado no processo clínico: profundidades de sondagem ≤ 3 mm e sem perdas ósseas radiográficas (Papapanou et al., 2018; Steffens & Marcantonio, 2018).

Grupo B- pacientes com periodontite:

- Exploração clínica: hemorragia gengival e hemorragia à sondagem; presença de placa; profundidades de sondagem > 3 mm e perdas ósseas radiográficas (Papapanou et al., 2018; Steffens & Marcantonio, 2018).

Os critérios de exclusão:

- Mulheres grávidas ou lactantes;
- Desdentados totais;
- Pacientes que sofram de doenças autoimunes, pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatite B e hepatite C;
- Pacientes com uso agudo ou crónico de medicamentos xerostomizantes;
- Pacientes em radioterapia;
- Pacientes que tivessem realizado tratamentos periodontais;
- Pacientes com dados incompletos.

3.3. Recolha de dados

3.3.1. Questionário

No início da consulta foi apresentado a todos os pacientes incluídos no estudo um questionário que foi explicado ao paciente e seguidamente preenchido pelo mesmo.

As questões colocadas foram as seguintes:

- É fumador/a?

- Costuma ingerir bebidas alcoólicas?
- Qual a quantidade de água ingerida diariamente?
- Costuma ter uma dieta rica em vegetais e fruta?
- Costuma ter uma dieta rica em carnes processadas?
- Está a fazer alguma suplementação vitamínica?
- Tem sensação de boca seca?
- Considera que tem uma elevada quantidade de *stress* psicológico, cansaço físico ou ansiedade na sua vida?

3.3.2. História clínica

Após a recolha das amostras foram consultados os processos dos pacientes de modo a recolher os seguintes dados:

- Idade;
- Género;
- Patologias sistémicas;
- Medicação.

3.4. Protocolo clínico

Antes da recolha das amostras foi realizada a calibração do examinador por um segundo examinador experiente, com recurso a 4 pacientes voluntários não incluídos no estudo.

A recolha da saliva não-estimulada foi feita através do *kit* de recolha da *Salimetrics*®, enquanto as amostras de FCG foram recolhidas através das tiras de papel absorvente.

Neste estudo, a recolha da saliva realizou-se previamente à recolha de FCG para que não houvesse contaminação da amostra, pois após o contacto das tiras de papel com a gengiva é frequente existir hemorragia. Esta sequência facilita igualmente a realização de um isolamento com rolos de algodão, *dry-tips*® e *sani-tip*®, aquando da recolha do FCG, não afetando a quantidade de saliva recolhida da cavidade oral (Han et al., 2013; Topcu et al., 2014).

3.4.1. Recolha da saliva

- 1- Antes da recolha da saliva foi pedido aos participantes que realizassem um bochecho com água durante 5 minutos;
- 2- Durante este período foram preparados e devidamente rotulados os kits de recolha de amostras de saliva da *Salimetrics*®, (figura 14B);
- 3- Os participantes foram orientados a não engolir a saliva (saliva passiva) durante 3 minutos para que houvesse um acúmulo da mesma no fundo da boca;
- 4- De seguida, com a cabeça inclinada para a frente foi pedido aos participantes que guiassem a saliva para o frasco através do SCA, (figura 14E);
- 5- O SCA foi removido e devidamente descartado;
- 6- A tampa foi colocada no frasco de colheita e foi confirmado que estava apertada corretamente;
- 7- Após a recolha da saliva, os frascos foram imediatamente colocados numa caixa térmica a 4°C e transportados para o laboratório (permanecendo na mesma menos de 2 horas), (figura 14D);
- 8- A amostra foi centrifugada a 10.000 x g durante 10 minutos;
- 9- Após a obtenção do sobrenadante, as amostras foram aliqüotadas e armazenadas a -20°C para futuras análises.

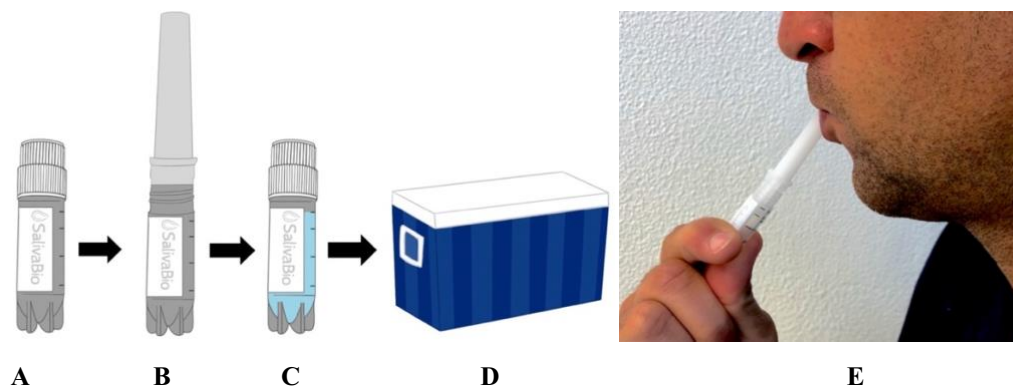


Figura 14- Método de recolha da amostra de saliva. A: Frasco de colheita (cryovials) devidamente rotulado; B: Frasco de colheita com o auxiliar de recolha da saliva (SCA); C: Frasco de colheita com saliva; D: Caixa térmica a 4°C; E-: Momento da recolha da amostra da saliva.

3.4.2. Recolha do fluido crevicular gengival

No momento da recolha, o examinador apenas teve informação da localização em que deveria fazer a mesma (bolsas mais profundas).

O protocolo de recolha de FCG foi o seguinte:

- 1- Foram utilizadas 6 tiras de papel absorventes com capacidade de absorver 0 a 1,2 μ l de fluido;
- 2- A recolha de fluido foi feita preferencialmente nos incisivos centrais e laterais superiores (figura 15), principalmente no caso de pacientes com saúde periodontal, onde está reportado haver maior quantidade tanto de nitrito como de NO (Chami et al., 2018). Nos pacientes com periodontite deu-se preferência a locais com existência de bolsas (profundidade de sondagem > 3mm);
- 3- Imediatamente a seguir à recolha de fluido as tiras de papel foram colocadas em tubos de *ependorf* devidamente identificados, (figura 16B e figura 17);
- 4- O volume de fluido de FCG recolhido em cada tira de papel foi quantificado utilizando o *Periotron® 8010* (no programa “PERIO”) cujo “zero” foi pré-calibrado com uma tira de papel seca, (figura 16C);
- 5- De seguida, as tiras foram sequencialmente colocadas num segundo tubo de *ependorf*, o qual foi armazenado numa caixa térmica a 4°C (permanecendo na mesma um período inferior a 2 horas), (figura 16D);
- 6- Tal como as amostras de saliva, as tiras de papel com FCG foram transportadas para o laboratório para análise imediata. Esta amostra não sofreu quaisquer processos de centrifugação. Devido às quantidades reduzidas da mesma não foi possível armazená-la para posteriores análises.



Figura 15- Método de recolha da amostra de fluido crevicular gengival com os PerioPaper® Gengival Fluid Collection Strips.

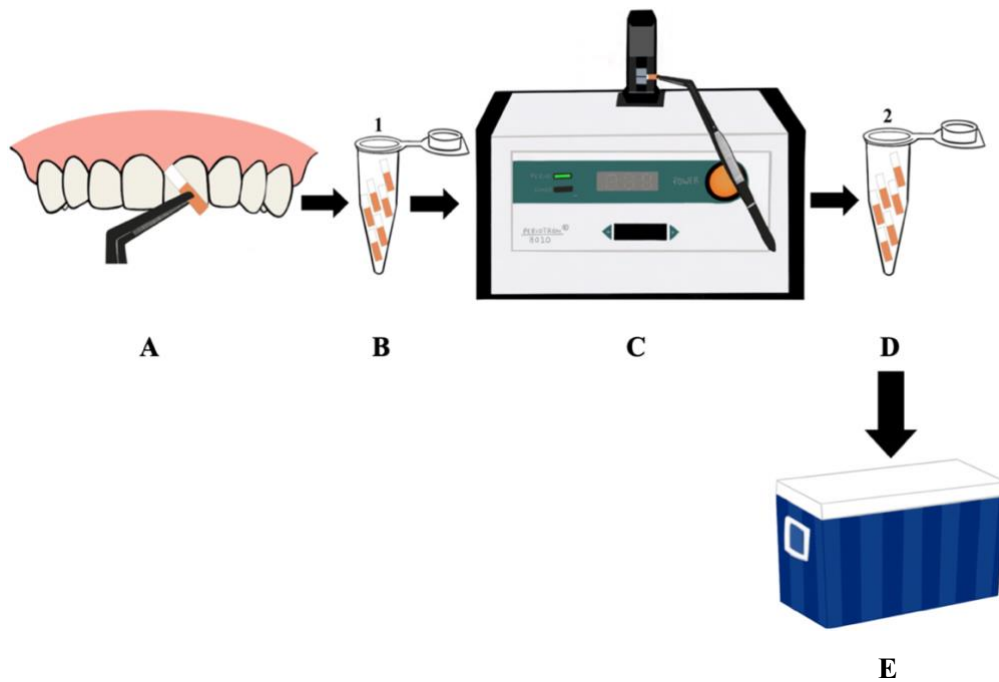


Figura 16- Método de recolha da amostra de fluido crevicular gengival. A: Recolha da amostra com os PerioPaper® Gingival Fluid Collection Strips; B: Primeiros tubos de eppendorf devidamente identificados com as tiras de papel; C: Leitura dos volumes da amostra pelo Periotron® 8010; D: Segundos tubos de eppendorf com as tiras de papel com o volume medido; E: Caixa térmica a 4°C.



Figura 17- Tubos de eppendorf devidamente identificados (código atribuído a cada paciente).

3.5. Quantificação de nitrito pelo método colorimétrico de Griess

3.5.1. Lei de Beer-Lambert (absorvância vs concentração)

Através da Lei de Beer-Lambert é possível converter a absorvância (nm) em concentração (μM), estando estas concentrações dentro de um intervalo de valores de uma curva de calibração. A equação representativa da lei de Beer-Lambert é representada pela Figura 18A e os processos de incidência e transmissão de luz estão esquematizados na Figura 18B (Mayerhöfer et al., 2020).

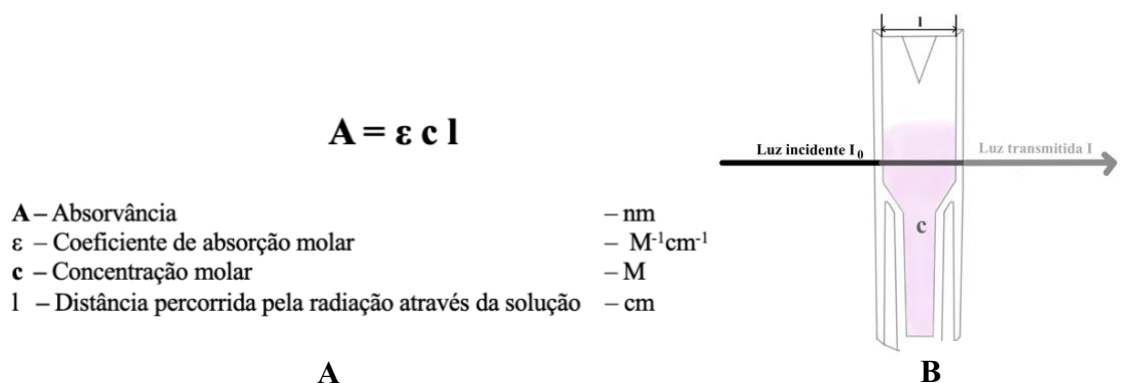


Figura 18- A: Equação da Lei de Beer-Lambert; B: Espectrofotômetro: processo de incidência de luz e transmissão de luz através da cuvete com a solução.

3.5.2. Preparação da solução nitrito e reagentes SA e NEDA

Para a utilização da reação de Griess como método colorimétrico de quantificação do nitrito, foi necessário a preparação de 3 soluções: solução padrão de nitrito (para realizar a curva de calibração) e reagentes SA e NEDA, como indicado na Tabela 4.

Tabela 4- Soluções, reagentes e quantidades necessárias para a reação de Griess.

SOLUÇÃO	REAGENTES	QUANTIDADE
Solução Padrão (Nitrito, 10 mM)	Nitrito de Sódio	0,69 g
	Hidróxido de sódio a 0,02%	0,25 g
	Água destilada	até 1L
SA (1% m/v)	Sulfanilamida	2 g
	Ácido clorídrico a 37%	50 ml
	Água destilada	até 200 ml
NEDA (0.02% m/v)	N-(1-naftil)-etilenodiamina	0,04 g
	Água destilada	até 200 ml

Após a realização de experiências prévias, concluiu-se que era necessário diluir 5x a solução *stock* de nitrito para que, os valores de absorvância se encontrassem abaixo de 1 e respeitassem a Lei de Beer-Lambert.

3.5.3. Análise das amostras

Tal como referido anteriormente, o nitrito presente nas amostras de saliva e de FCG foi quantificado indiretamente, através do método de Griess no qual se forma um composto corado, numa quantidade estequiometricamente igual à do nitrito existente na solução. Por conseguinte, a intensidade da cor gerada é proporcional à concentração deste último.

Após recolha e antecedendo a sua análise pelo método colorimétrico de Griess, as amostras sofreram um tratamento prévio conforme está seguidamente descrito.

Protocolo de tratamento da saliva (figura 19):

- 1- No laboratório, a saliva presente nos frascos é transferida para tubos de *eppendorf* devidamente identificados com a utilização de micropipetas, (figura 19-1C);
- 2- Centrifugação dos tubos de *eppendorf* a 10.000 x g, durante 10 minutos, (figura 19-1D);
- 3- Transferência de 50 µl (ou de 25 µl) de sobrenadante para uma cuvete. Caso haja excesso de saliva, preparar alíquotas de 500 µl para tubos de *eppendorf*, (figura 19-2B e figura 19-2C);
- 4- Às cuvetes com 50 µl de saliva foram adicionadas 950 µl de água destilada e às cuvetes com 25 µl, foram adicionadas 975 µl de água destilada, (figura 19-2D e figura 19-2E);
- 5- A cada cuvete foram adicionadas sequencialmente, com micropipetas, 250 µl de reagente SA e 250 µl de reagente NEDA, (figura 19-3);
- 6- Após a adição dos reagentes, esperou-se 10 minutos e avaliou-se de imediato a absorvância (540 nm), (figura 19-5);

Protocolo de tratamento do FCG (figura 20):

- 1- No laboratório, cortar a porção não absorvente (laranja) das tiras de papel e colocar a porção branca dentro da cuvete, num total de 6 tiras por cuvete, (figura 20-1B e figura 20-1C);
- 2- Adicionar a cada cuvete 1 ml de água destilada, (figura 20-1D);
- 3- A cada cuvete adicionar sequencialmente, com micropipetas, 250 µl de reagente SA e 250 µl de reagente NEDA, (figura 20-2A e figura 20-2B);
- 4- Após a adição dos reagentes, esperar 10 minutos e avaliar de imediato a absorvância (540 nm), (figura 20-4);

Nota: As concentrações de nitrito na saliva foram estimadas por interpolação na curva de calibração, (figura 22), considerando um fator de diluição 1:30 (saudáveis) e 1:60 (com periodontite). Os valores de nitrito no FCG foram estimados considerando a concentração no extrato de 1 ml. Dada a dificuldade em estimar com rigor o volume de amostra extraída nas tiras de papel, optámos por não corrigir a concentração pelo fator de diluição. Por

consequente, os valores apresentados correspondem à concentração de nitrito tal como diluída no ensaio, como tal estes valores serão muito inferiores aos reais. Assim, para efeitos de referência, os valores de nitrito no FCG são acompanhados dos volumes estimados pelo *Periotron® 8010*.

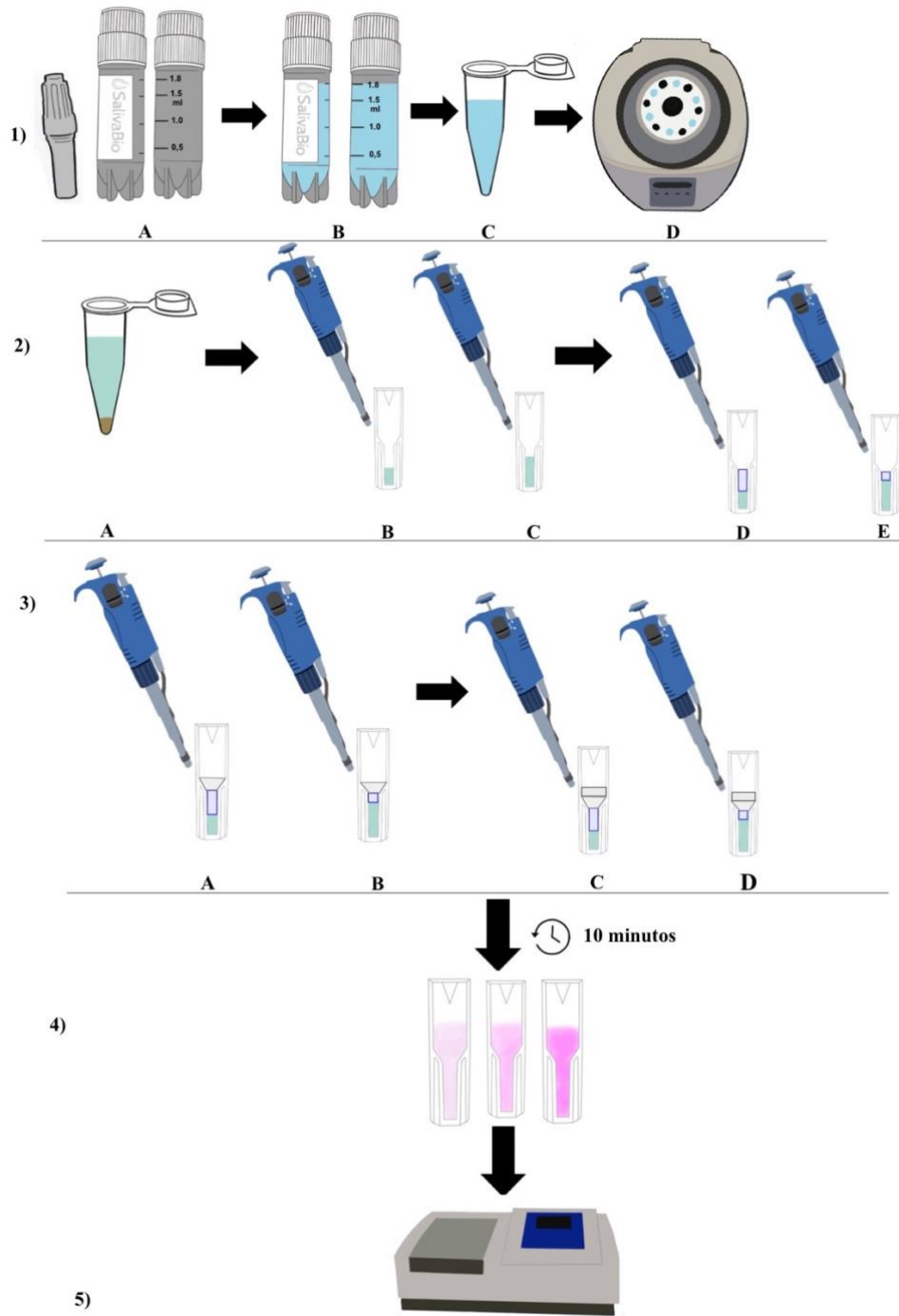


Figura 19- Protocolo do método de Griess para a saliva. 1A: Frasco de colheita (*cryovials*); 1B: Frasco de colheita com saliva; 1C: Transferência da saliva para o tubo de *ependorf*; 1D: Centrifugação dos tubos de *ependorf* a 10.000 x g durante 10 minutos; 2A: Obtenção do sobrenadante; 2B e 2C: Transferência de 25 µl e de 50 µl de sobrenadante para uma cuvette; 2D e 2E: Adição de 975 e 950 µl de água destilada; 3A e 3B: Adição do reagente SA; 3C e 3D: Adição do reagente NEDA; 4: Esperar 10 minutos; 5: Análise das amostras pelo espectrofotômetro.

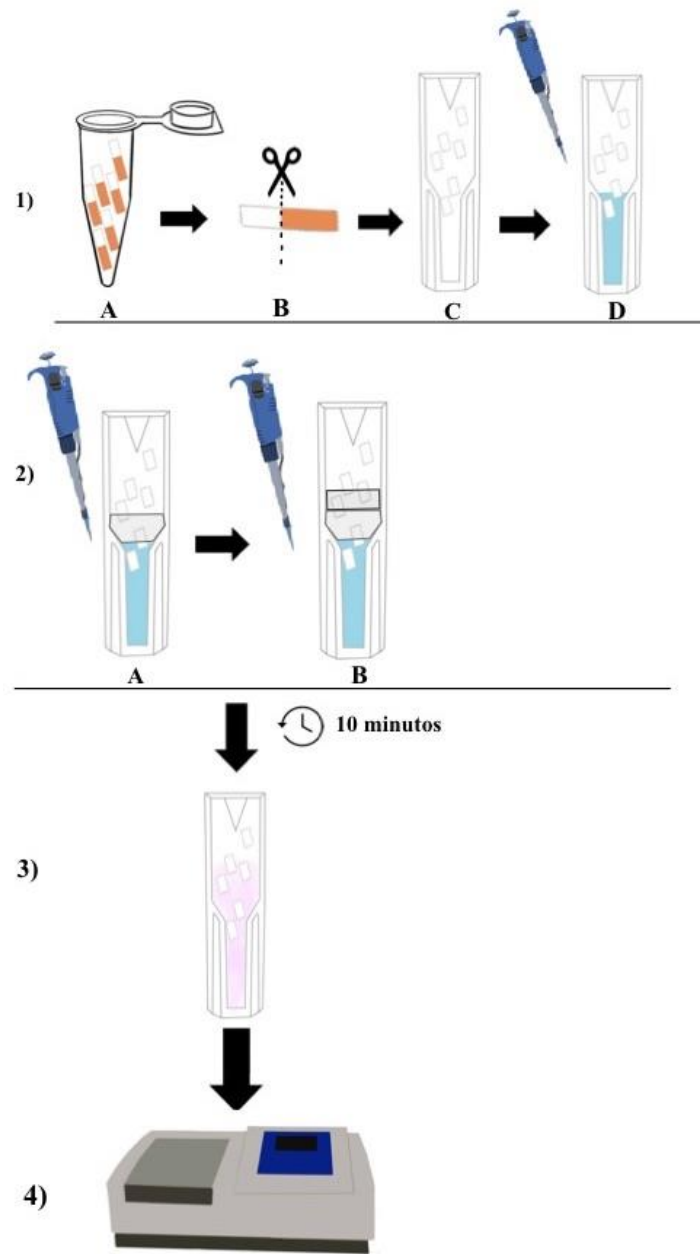


Figura 20- Protocolo do método de Griess para o fluido crevicular gengival. 1A: 6 tiras de papel no tubo de eppendorf; 1B: Corte da parte colorida de laranja dos papéis; 1C: Parte branca absorvente dos papéis na cuvete; 1D: Adição de 1 ml de água destilada; 2A: Adição do reagente SA; 2B: Adição do reagente NEDA; 3: Esperar 10 minutos; 4: Análise das amostras pelo espectrofotômetro.

3.6. Ensaio controle

Com a utilização das tiras de papel, havia a possibilidade de o material das mesmas colorirem a solução. Assim, foi necessário confirmar que não havia interferência pelo que, depois do corte da porção laranja foram colocadas numa cuvete 6 tiras de papel

absorvente sem FCG. A esta cuvete foram adicionadas as soluções SA e NEDA e depois de 10 minutos foi confirmado que estas tiras não coloriam a solução, (figura 21).



Figura 21- Cuvete com as 6 tiras de *PerioPaper®* Gengival Fluid Collection Strips, solução SA e NEDA, sem coloração.

3.7. Exclusão do estudo

Após obter os valores de absorvância das amostras, foi observado que no total 3 pacientes apresentavam valores de absorvância fora do intervalo de valores apresentado pela curva de calibração. Desta forma, os valores de absorvância e de concentração destes 3 pacientes, 1 paciente com saúde periodontal e 2 pacientes com doença periodontal, não foram considerados para a análise estatística.

3.8. Análise estatística

Todos os dados recolhidos no decorrer do estudo foram armazenados numa base de dados no software *Microsoft Office Excel®* 2021 versão 16.49 (Microsoft, Seattle, USA). Para a realização da análise estatística foi utilizado o programa *IBM SPSS Statistics*, versão 27.0 para o *Windows* (Armonk, NY: IBM Corp.) sendo utilizadas metodologias de análise estatística descritiva e inferencial. Nesta última, foi estabelecido um nível de significância de 5%.

III. RESULTADOS

1. Calibração

1.1. Quantificação do nitrito pelo método de Griess

Tal como referido anteriormente, a concentração de nitrito nas amostras de saliva e de FCG baseou-se no método colorimétrico de Griess, no qual se forma um composto azo com um máximo de absorvância a 540 nm, sendo o mesmo proporcional à concentração de nitrito em solução. Antecedendo a análise das amostras, foi traçado uma curva de calibração usando as soluções padrão de nitrito e as mesmas soluções *stock* usadas no método de Griess. A Tabela 5 apresenta os valores de concentração de nitrito (μM), volume de nitrito (μl) e volume de água (μl) utilizados para realizar as diluições que permitiram traçar a curva de calibração (após cada diluição aguardou-se 10 minutos e efetuou-se as medições de absorvância a 540 nm). A Figura 22 mostra o gráfico obtido e a respetiva equação, a partir da qual, por interpretação, se estimaram as concentrações de nitrito nas amostras analisadas.

Tabela 5- Concentrações e volumes para preparação da solução padrão nitrito (1 ml).

CONCENTRAÇÃO NITRITO (μM)	VOLUME NITRITO (μl)	VOLUME ÁGUA (μl)
1,3	10	90
2,7	20	80
4,0	30	70
5,3	40	60
6,7	50	50
8,0	60	40
9,3	70	30
10,7	80	20
12	90	10
13	100	0

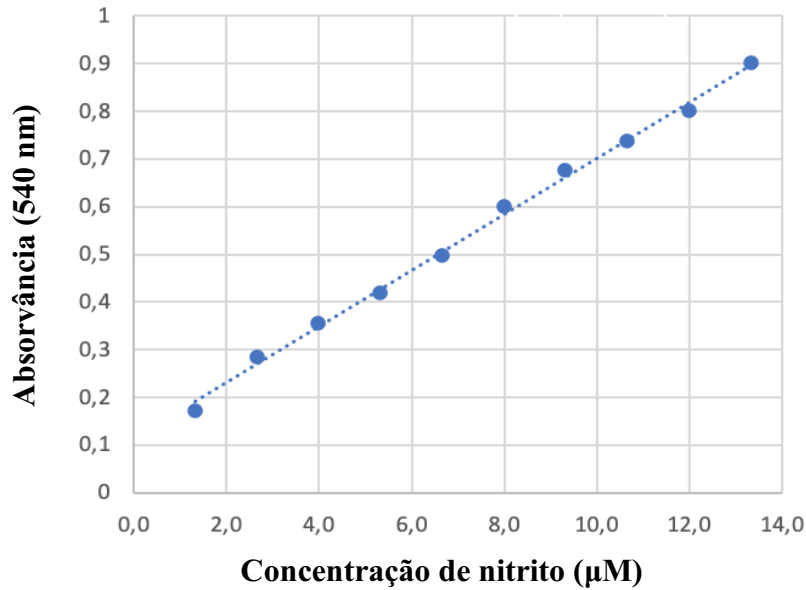


Figura 22- Curva de calibração para quantificação de nitrito pelo método de Griess. Parâmetros: $y = 0,0588x + 0,112$; $r^2 = 0,997$.

1.2. Determinação do volume de amostra de FCG recolhido nas tiras de papel

Dado as amostras de FCG terem sido recolhidas por absorção pelas tiras de papel, foi necessário estimar o volume extraído através da sua análise pelo *Periotron® 8010*. Para tal, o equipamento foi previamente calibrado, tendo sido obtido o gráfico apresentado na Figura 23.

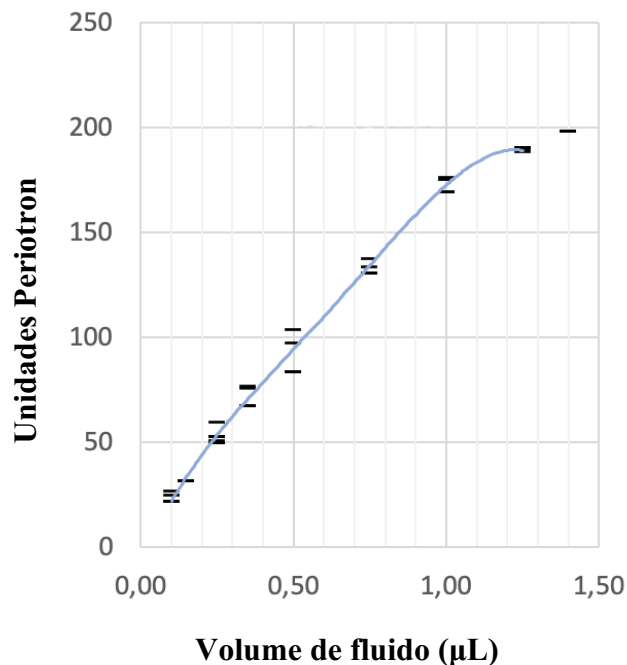


Figura 23- Curva de calibração. Parâmetros: $y = -203,42x^4 + 497,92x^3 - 435,3x^2 + 319,78x - 6,2895$; $r^2 = 0,9994$.

2. Relação entre as concentrações de nitrito na saliva e no FCG em pacientes com doença periodontal e em pacientes periodontalmente saudáveis

Devido à uma dimensão reduzida da amostragem, o teste *t-student* não apresentou diferenças estatisticamente significativas nos vários grupos. Deste modo, a análise feita neste estudo piloto foi descritiva e aferiu-se apenas sobre a tendência das concentrações de nitrito consoante cada variável.

Na Tabela 6 são apresentadas as concentrações de nitrito do grupo dos pacientes periodontalmente saudáveis e do grupo dos pacientes com periodontite. É de notar, que há uma tendência para as concentrações de nitrito, tanto na saliva como no FCG, estarem mais elevadas no grupo dos participantes com periodontite, o que permite relacionar de uma forma preliminar, os valores de nitrito aumentados e a presença de doença periodontal.

Tabela 6- Influência do diagnóstico periodontal nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

		N (%)	Saliva	FCG	
			Concentração (μM)	Volume (μl)	Concentração (μM)
Diagnóstico Periodontal	Periodontalmente saudáveis	12 (50%)	190 \pm 27	0,58 \pm 0,02	3,3 \pm 0,3
	Periodontite	12 (50%)	364 \pm 62	5,0 \pm 0,2	4,7 \pm 0,8

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

3. Relação entre as concentrações de nitrito na saliva e no FCG e o estadio da doença periodontal

Este estudo permitiu aferir que há uma tendência para os pacientes que comparecem na Clínica Dentária Egas Moniz apresentarem estadios mais avançados da doença periodontal, não tendo sido incluído nenhum paciente com estadio I como representado na Figura 24. O estadio da doença periodontal foi obtido pelo processo clínico de cada participante no estudo.

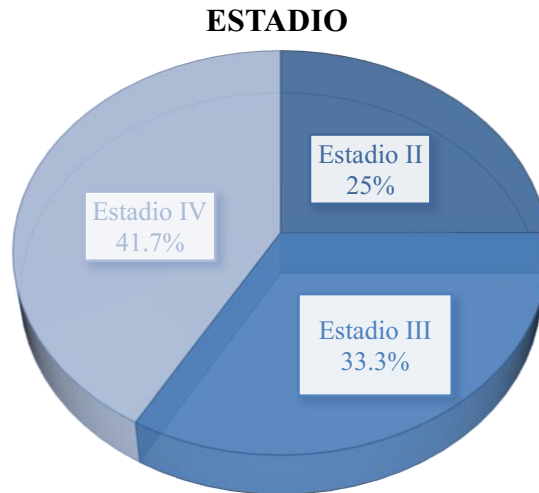


Figura 24- Representação gráfica da percentagem de pacientes de cada estadio da doença periodontal.

Como podemos observar pela Tabela 7, os valores tanto das concentrações de nitrito na saliva como das concentrações de nitrito no FCG tendem a aumentar com o aumento da severidade da periodontite (mais elevadas no estadio IV). Assim, parece haver uma predisposição para valores aumentados de nitrito e a severidade da doença periodontal.

Tabela 7- Influência do estadio nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

	N (%)	Saliva	FCG		
		Concentração (μM)	Volume (μl)	Concentração (μM)	
Estádios	II	3 (25%)	284 \pm 140	4,7 \pm 0,1	3,8 \pm 1,4
	III	4 (33,3%)	340 \pm 69	5,1 \pm 0,3	4,3 \pm 0,9
	IV	5 (41,7%)	430 \pm 119	5,2 \pm 0,2	5,5 \pm 1,7

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

4. Relação entre as concentrações de nitrito na saliva e no FCG e o grau da doença periodontal

Por sua vez, o grau da doença periodontal também foi obtido a partir do processo clínico de cada participante. Tal como ocorreu com o estadio, o número de pacientes pertencentes a cada grau não foi homogêneo com maior predominância dos graus B e C, (figura 25).

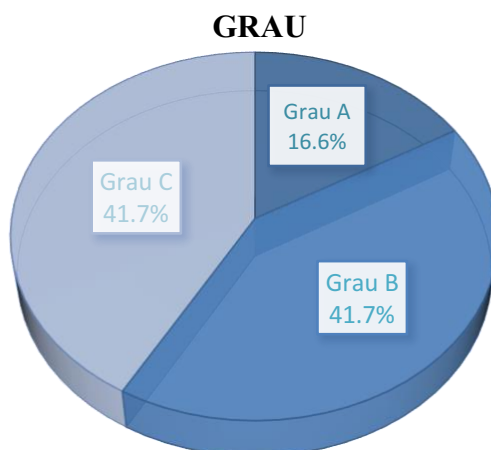


Figura 25- Representação gráfica da percentagem de pacientes de cada grau da doença periodontal.

Pela análise da Tabela 8 tal como ocorreu com o estadio, o aumento da taxa de progressão da doença periodontal (grau da periodontite), aparenta estar associado a uma elevação das concentrações de nitrito em ambos os fluidos orais.

Tabela 8- Influência do grau nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

		N (%)	Saliva	FCG	
			Concentração (μM)	Volume (μl)	Concentração (μM)
Grau	A	2 (16,6%)	145 \pm 17	4,7 \pm 0,2	2,7 \pm 1,4
	B	5 (41,7%)	366 \pm 77	4,9 \pm 0,2	4,1 \pm 0,5
	C	5 (41,7%)	450 \pm 112	5,3 \pm 0,2	6,0 \pm 1,7

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

5. Relação entre os fatores de risco e as concentrações de nitrito na saliva e no fluido crevicular gengival

Em relação à influência do género nas concentrações de nitrito observa-se que, relativamente à saliva, o género feminino apresenta uma predisposição para concentrações de nitrito superiores, (tabela 9). Relativamente aos valores de concentração no FCG, podemos observar que o género feminino apresenta tendência a concentrações inferiores comparativamente ao sexo masculino. Assim, não foi possível aferir sobre a influência do género nos níveis de nitrito.

Tabela 9- Influência do género nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

			Saliva	FCG	
		N (%)	Concentração (µM)	Volume (µl)	Concentração (µM)
Género	Feminino	17 (70,8%)	281 ± 41	2,1 ± 0,5	3,8 ± 0,4
	Masculino	7 (29,2%)	266 ± 88	4,5 ± 0,7	4,5 ± 1,3

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

No que diz respeito à influência da idade esta foi dividida em 3 grupos: idade entre os 18 - 30 anos; idade entre 31 - 64 anos e ≥ 65 anos, (tabela 10). Os valores da concentração de nitrito na saliva apresentaram uma tendência crescente com o aumento da idade. Por sua vez, os valores de concentração de nitrito no FCG foram relativamente semelhantes sendo que, os valores mais elevados pertencem ao grupo de ≥ 65 anos.

Tabela 10- Influência da idade nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

			Saliva	FCG	
		N (%)	Concentração (µM)	Volume (µl)	Concentração (µM)
Idade	18 - 30 anos	7 (29,2%)	198 ± 45	1,3 ± 0,7	3,8 ± 0,4
	31 - 64 anos	10 (41,7%)	287 ± 47	2,7 ± 0,7	3,6 ± 0,4
	≥ 65 anos	7 (29,2%)	340 ± 100	4,4 ± 0,6	4,6 ± 1,4

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

Relativamente às patologias sistémicas, os pacientes que não apresentavam nenhuma patologia mostraram uma tendência para terem valores de concentração de nitrito na saliva mais reduzidos, comparativamente aos pacientes com patologias. O mesmo, observou-se nas concentrações de nitrito no FCG, (tabela 11).

Tabela 11- Influência das patologias sistémicas nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

			Saliva	FCG	
		N (%)	Concentração (µM)	Volume (µl)	Concentração (µM)
Patologias sistémicas	Não	19 (79,2%)	234 ± 33	2,2 ± 0,5	3,5 ± 0,3
	Sim	5 (20,8%)	440 ± 111	5,2 ± 0,2	5,8 ± 1,6

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

Em relação à toma de medicação, pela análise dos valores de nitrito na saliva e no FCG, podemos observar que estas concentrações tendem a ser mais elevadas nos pacientes que tomavam medicação, comparativamente aos que não a tomavam, (tabela 12).

Tabela 12- Influência da toma de medicação nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

		N (%)	Saliva	FCG	
			Concentração (μM)	Volume (μl)	Concentração (μM)
Medicação	Não	18 (75%)	223 \pm 33	2,0 \pm 0,5	3,5 \pm 0,3
	Sim	6 (25%)	438 \pm 90	5,0 \pm 0,2	5,4 \pm 1,4

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

No que diz respeito ao *stress* psicológico, tanto as concentrações de nitrito na saliva como no FCG, foram tendencialmente menores nos pacientes que indicaram sofrer de *stress* psicológico. Assim, o *stress* psicológico não aparenta aumentar os valores de concentração do nitrito, (tabela 13).

Tabela 13- Influência do stress psicológico nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

		N (%)	Saliva	FCG	
			Concentração (μM)	Volume (μl)	Concentração (μM)
Stress psicológico	Não	11 (45,8%)	303 \pm 66	3,9 \pm 0,6	4,8 \pm 0,8
	Sim	13 (54,2%)	255 \pm 43	1,8 \pm 0,6	3,2 \pm 0,3

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

Contrariamente ao *stress* psicológico, os participantes que assinalaram evidenciar cansaço físico, apresentavam tendência para ter valores de concentração de nitrito na saliva e no FCG mais elevados, (tabela 14).

Tabela 14- Influência do cansaço físico nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

		N (%)	Saliva	FCG	
			Concentração (μM)	Volume (μl)	Concentração (μM)
Cansaço físico	Não	9 (37,5%)	209 \pm 39	3,2 \pm 0,8	3,3 \pm 0,4
	Sim	15 (62,5%)	317 \pm 54	2,6 \pm 0,6	4,4 \pm 0,6

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

Por sua vez, relativamente à ansiedade, observou-se uma tendência para os valores de concentração na saliva e no FCG serem maiores nos pacientes que não referiam ter ansiedade, (tabela 15).

Tabela 15- Influência da ansiedade nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

		N (%)	Saliva	FCG	
			Concentração (µM)	Volume (µl)	Concentração (µM)
Ansiedade	Não	10 (41,7%)	286 ± 68	3,6 ± 0,7	4,2 ± 0,9
	Sim	14 (58,3%)	270 ± 44	2,2 ± 0,6	3,8 ± 0,4

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

Relativamente à sensação de boca seca, os pacientes que responderam positivamente a esta questão apresentaram predisposição para valores de concentração de nitrito na saliva e no FCG mais elevados, (tabela 16).

Tabela 16- Influência da sensação de boca seca nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

		N (%)	Saliva	FCG	
			Concentração (µM)	Volume (µl)	Concentração (µM)
Boca seca	Não	15 (62,5%)	242 ± 36	2,6 ± 0,6	3,7 ± 0,4
	Sim	9 (37,5%)	334 ± 81	3,2 ± 0,8	4,4 ± 1,0

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

No que respeita aos fumadores, é perceptível que os valores da concentração de nitrito em ambos os fluidos aparentam ser superiores nos não fumadores. Assim, não é estabelecida uma relação entre este fator e os níveis de nitrito nos fluidos orais (tabela 17).

Tabela 17- Influência do tabagismo nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

		N (%)	Saliva	FCG	
			Concentração (µM)	Volume (µl)	Concentração (µM)
Fumador	Não	18 (75%)	284 ± 41	2,8 ± 0,5	4,3 ± 0,6
	Sim	6 (25%)	256 ± 96	2,7 ± 1,0	3,0 ± 0,4

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

Relativamente aos ex-fumadores, os valores de concentração na saliva e no FCG apresentaram uma tendência para serem superiores, comparativamente aos valores dos

não ex-fumadores. Deste modo, o fator “ex-fumador” aparenta influenciar os valores de concentração do nitrito, (tabela 18).

Tabela 18- Influência da variável “ex-fumador” nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

		N (%)	Saliva	FCG	
			Concentração (μM)	Volume (μl)	Concentração (μM)
Ex-fumador	Não	20 (83,3%)	242 \pm 32	2,3 \pm 0,5	3,3 \pm 0,2
	Sim	4 (16,7%)	452 \pm 141	5,2 \pm 0,2	7,1 \pm 1,8

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

Quanto ao consumo de bebidas alcoólicas, a maioria dos indivíduos da amostra (70,8%), consumiam bebidas alcoólicas sendo este grupo o que teve tendência a apresentar valores inferiores de concentração de nitrito na saliva e no FCG, (tabela 19).

Tabela 19- Influência do consumo de bebidas alcoólicas nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

		N (%)	Saliva	FCG	
			Concentração (μM)	Volume (μl)	Concentração (μM)
Consumo de bebidas alcoólicas	Não	7 (29,2%)	328 \pm 49	2,3 \pm 0,8	4,4 \pm 0,6
	Sim	17 (70,8%)	256 \pm 49	3,0 \pm 0,6	3,8 \pm 0,6

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

Em relação à quantidade de água ingerida diariamente, os participantes que referiram beber menos de 1 litro por dia foram os que apresentaram valores de concentração de nitrito tendencialmente mais elevados. O mesmo aconteceu para o FCG. Assim, é de notar que o baixo consumo de água parece estar relacionado com as elevadas concentrações de nitrito em ambos os fluidos orais, (tabela 20).

Tabela 20- Influência da ingestão de água nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

		N (%)	Saliva	FCG	
			Concentração (μM)	Volume (μl)	Concentração (μM)
Quantidade de água ingerida diariamente	< 1L	10 (41,7%)	345 \pm 73	3,2 \pm 0,7	4,8 \pm 0,9
	1L a 3L	12 (50%)	226 \pm 41	2,8 \pm 0,7	3,2 \pm 0,3
	> 3L	2 (8,3%)	239 \pm 23	0,6 \pm 0,1	4,5 \pm 1,0

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

No que diz respeito ao consumo regular de vegetais e frutas, o valor de concentração de nitrito na saliva parecer estar mais elevado nos pacientes que não têm uma dieta rica em vegetais. O contrário acontece no FCG, pois neste fluido os pacientes que tinham uma dieta rica em vegetais foram os que apresentaram valores de nitrito superiores. Deste modo, não é possível estabelecer uma relação entre o consumo regular de vegetais e frutas com as concentrações de nitrito nestes fluidos, (tabela 21).

Tabela 21- Influência do consumo regular de vegetais e frutas nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

		N (%)	Saliva	FCG	
			Concentração (µM)	Volume (µl)	Concentração (µM)
Consumo regular de vegetais e frutas	Não	4 (16,7%)	342 ± 95	1,5 ± 1,0	3,4 ± 0,3
	Sim	20 (83,3%)	264 ± 41	3,1 ± 0,5	4,1 ± 0,5

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

O consumo regular de carnes processadas, não altera significativamente os valores de concentrações de nitrito na saliva. No caso do FCG, os pacientes que assinalaram terem uma dieta rica em carnes processadas apresentaram uma tendência para valores de concentração de nitrito superiores, (tabela 22).

Tabela 22- Influência do consumo regular de carnes processadas nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.

		N (%)	Saliva	FCG	
			Concentração (µM)	Volume (µl)	Concentração (µM)
Consumo regular de carnes processadas	Não	10 (41,7%)	287 ± 64	2,7 ± 0,7	3,4 ± 0,5
	Sim	14 (58,3%)	269 ± 47	2,9 ± 0,6	4,4 ± 0,7

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

Por fim, relativamente à realização ou não de suplementação vitamínica, tanto as concentrações de nitrito na saliva como no FCG pareceram estar mais elevadas para os pacientes que não realizavam suplementação, (tabela 23).

Tabela 23- *Influência da suplementação vitamínica nas concentrações de nitrito na saliva e no FCG.*

		Saliva		FCG	
		N (%)	Concentração (μM)	Volume (μl)	Concentração (μM)
Suplementação vitamínica	Não	16 (66,7%)	322 \pm 50	3,0 \pm 0,6	4,4 \pm 0,6
	Sim	8 (33,3%)	186 \pm 40	2,3 \pm 0,8	3,2 \pm 0,4

Nota: Os erros apresentados correspondem ao desvio padrão do valor médio.

IV. DISCUSSÃO

Este estudo piloto teve como objetivos, comparar os níveis de concentração de nitrito na saliva e no FCG em pacientes com periodontite e pacientes periodontalmente saudáveis e ainda, avaliar a possível correlação entre os níveis de nitrito e os diferentes estádios e graus da periodontite. A amostra foi constituída por 24 pacientes da Clínica Dentária Egas Moniz, 12 das consultas de periodontologia e os restantes 12 pacientes das outras áreas das consultas da clínica integrada do 5º ano. De acordo com a análise dos resultados obtidos neste estudo preliminar, no geral, a dimensão da amostra não permitiu retirar conclusões estatisticamente válidas. Como tal, apenas serão tecidas considerações de foro descritivo.

Em primeiro lugar, a amostra não apresentou uma distribuição homogénea relativamente ao género, sendo 17 (70,8%) dos participantes do género feminino e 7 (29,2%) dos participantes do sexo masculino. Após a avaliação dos resultados, as concentrações de nitrito na saliva apresentaram uma tendência para estarem mais elevadas no género feminino. No entanto, no FCG as concentrações de nitrito pareceram estar mais elevadas no género masculino, o que não permitiu relacionar o género com os valores de nitrito. Estudos anteriores correlacionaram o género e as concentrações deste metabolito, obtendo concentrações de metabolitos do NO superiores no género feminino. A atividade da nitrato redutase da microbiota oral nas mulheres demonstrou ser substancialmente maior do que nos homens no entanto, esta diferença foi justificada pelos autores devido à possibilidade da expressão e atividade da nitrato redutase bacteriana ser influenciada por hormonas sexuais femininas ou masculinas (Han et al., 2013; Kapil et al., 2018; Scarel-Caminaga et al., 2017). No estudo realizado por Kapil et al. (2018), mencionado na Tabela 3, o sexo feminino apresentou valores de nitrito aproximadamente 230 μM e 120 μM para o sexo masculino. No presente estudo, na saliva os valores de nitrito no sexo feminino ($281 \pm 41 \mu\text{M}$), foram relativamente semelhantes aos estudos anteriormente referidos porém, os valores de nitrito no sexo masculino pareceram estar mais elevados ($266 \pm 88 \mu\text{M}$).

Os resultados obtidos neste estudo, relativamente à faixa etária tanto na saliva como no FCG, indicaram que os participantes com idade mais avançada tenderam a ter valores de nitrito mais elevados, ($340 \pm 100 \mu\text{M}$) e ($4,6 \pm 1,4 \mu\text{M}$), respetivamente, apesar

das restantes idades não apresentarem concentrações concordantes na saliva e no FCG. Os resultados deste estudo, estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores nos quais, os níveis de nitrito apresentaram-se mais elevados nos pacientes com mais idade (Allaker et al., 2001; Nazir, 2017; Topcu et al., 2014).

No presente estudo, a presença de patologias sistémicas e a toma de medicação parecem ter uma relação com os valores de concentração de nitrito aumentados, tanto na saliva como no FCG. Estes resultados estão de acordo com os estudos anteriormente realizados que, afirmam que os níveis de NO e seus metabolitos estão aumentados em pacientes que apresentam hipertensão arterial, diabetes mellitus, patologias cardíacas entre outras e/ou que fazem medicação. A redução de nitrito para NO durante a hipóxia fisiológica e patológica contribuem para sinalização hipóxica fisiológica, vasodilatação, modulação da respiração celular e a resposta celular a tensões isquémicas (Ashworth et al., 2015; Bryan, 2016; Han et al., 2013; Lundberg et al., 2008; Oliveira-Paula & Tanus-Santos, 2019; Wang et al., 2019; Zhao et al., 2015).

Em relação aos resultados dos fatores psicossociais, o *stress* psicológico e a ansiedade não evidenciaram influenciar os níveis de nitrito. O contrário ocorreu com o cansaço físico, no qual os participantes que o assinalaram apresentavam uma tendência para valores de nitrito aumentados. Os estudos realizados anteriormente, sobre a influência do NO e do nitrito, não diferenciam estes três fatores. Porém, referem que em situações de *stress*, disfunção endotelial, situações de hipóxia, défice de oxigénio e em situações de exercício exigente, há uma estimulação de oxidação de NO em nitrito que servirá de *stock* complementar (Bhattarai et al., 2018; Hord et al., 2009; Nazir, 2017; Qu et al., 2016).

No presente estudo, os participantes que referiam ter sensação de boca seca apresentaram uma tendência para valores de concentração de nitrito mais elevados ($334 \pm 81 \mu\text{M}$) e ($4,4 \pm 1,0 \mu\text{M}$) na saliva e no FCG, respetivamente, comparados com os participantes que não assinalaram este fator. Estudos realizados em pacientes com Síndrome de Sjögren, que apresentavam sensação de boca seca, obtiveram níveis de concentração de nitrito mais elevados em comparação a pacientes saudáveis (Kontinen et al., 1997; Wanchu et al., 2000). Contudo, outro estudo revelou que o nitrito presente na saliva não está aumentado em pacientes com valores de saliva inferiores ao normal

(Xia et al., 2003). Deste modo, os estudos realizados sobre a xerostomia, são discordantes em relação à sua influência na produção em déficit ou em demasia deste metabolito.

Relativamente às questões “fumador” e “ex-fumador”, a amostra obtida neste estudo foi bastante heterogênea, com a maioria dos participantes a não ser fumador (75%) e não ex-fumador (83,3%). Os resultados obtidos destas duas questões aparentam ser contraditórias, pois os fumadores apresentam valores de concentração de nitrito na saliva, ($256 \pm 95 \mu\text{M}$) e no FCG ($3,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$) mais reduzidos relativamente ao grupo dos não-fumadores. No entanto, os ex-fumadores apresentam valores de concentração na saliva, ($452 \pm 141 \mu\text{M}$) e no FCG ($7,1 \pm 1,8 \mu\text{M}$) aumentados. Os estudos anteriormente realizados sobre estes fatores também não apresentam resultados concordantes. Em certos estudos, o tabagismo está conectado a uma produção deficitária de NO e noutros este fator está associado a valores aumentados NO e seus metabolitos (Bachtiar et al., 2019; Wang et al., 2019). Bachtiar et al. (2019), obteve diferenças significativas entre as concentrações de NO em fumadores e não fumadores sendo que, os fumadores apresentaram valores mais elevados ($185.4 \mu\text{M}$) comparativamente aos não fumadores ($139.5 \mu\text{M}$). Assim, conclui-se que a relação do tabagismo e dos valores de concentração deste metabolito é um assunto controverso.

Dados obtidos noutros estudos apontaram a dieta como a maior fonte de exposição ao nitrito e nitrato (Bryan, 2016; Hord et al., 2009; McKnight et al., 1997). Neste trabalho e ao contrário do que é referido na literatura, apenas o baixo consumo de água influenciou positivamente os valores de concentração de nitrito sendo que, os fatores “Consumo de bebidas alcoólicas”, “Consumo regular de vegetais e frutas”, “Consumo regular de carnes processadas” e “Suplementação vitamínica” não mostraram influenciar as concentrações de nitrito. Estes resultados devem ser avaliados com prudência dado o escasso número de pacientes considerado no estudo. Tal como indicado na Tabela 3, McKnight et al. (1997), realizou um estudo com o objetivo de avaliar a influência do nitrato proveniente da dieta, no qual foi administrado oralmente 2 mmol de nitrato inorgânico aos participantes, tendo sido considerado $53,9 \mu\text{M}$ o valor médio de nitrito salivar do grupo de controle. Após 40 minutos, verificou-se que o valor de nitrito tinha aumentado para $761,5 \mu\text{M}$. Assim, este autor concluiu que a dieta era um fator que influenciava as concentrações de nitrito. Do mesmo modo, Bryan (2006),

avaliou a influência do nitrato proveniente da dieta, administrando uma dose de 4,6 mg/kg deste ião e verificou que, os valores médios passaram de 43,48 μM para 2173,91 μM evidenciando assim, a influência da dieta nas concentrações de nitrito. Os vegetais de folha verde, as frutas e as carnes processadas são apontados, por outros autores, como os alimentos que mais aumentam os valores de nitrito (Ashworth et al., 2015; Bryan, 2016; Hord et al., 2009; Karwowska & Kononiuk, 2020; McKnight et al., 1997).

Na amostra deste estudo piloto, observa-se uma discrepância tanto no número de participantes em cada estadio como em cada grau da doença periodontal. Após avaliar os resultados é evidente a tendência que, o agravamento da severidade da periodontite (estadio) e o aumento da taxa de progressão (grau), levam a valores crescentes de concentração de nitrito, tanto para a saliva como para o FCG. Estudos realizados anteriormente, não adotaram a nova nomenclatura de 2018 da doença periodontal. Os resultados obtidos neste estudo piloto, estão de acordo com os obtidos por Han et al. (2013), em relação à saliva, o qual obteve que na periodontite leve os valores foram ($228,57 \pm 44,7 \mu\text{M}$), na periodontite moderada foram ($233,21 \pm 71,19 \mu\text{M}$) e na periodontite agressiva foram ($524,85 \pm 83,46 \mu\text{M}$), referido na Tabela 3. Assim, este autor concluiu que há uma associação significativa entre a severidade da doença periodontal e os níveis de concentração do nitrito. Relativamente ao FCG são escassos os estudos que referem este fluido. Topcu et al. (2014) refere que as concentrações médias de nitrito no FCG foram ($0,83 \pm 0,31 \text{ nmol}$), na gengivite foram ($1,07 \pm 0,62 \text{ nmol}$) e na periodontite foram ($1,08 \pm 0,59 \text{ nmol}$). Este autor concluiu que os níveis totais de nitrito no FCG foram maiores nos grupos com periodontite e gengivite do que no grupo controle. No entanto, nem todos os autores obtiveram estes resultados. Aurer et al. (2001) obteve resultados opostos, onde houve um decréscimo nas concentrações de nitrito nos indivíduos com “periodontite de progressão rápida” e “periodontite adulta”. Os resultados do grupo de controle foram ($22,4 \pm 17,04 \mu\text{M}$), no grupo com “periodontite adulta” foram de ($11,1 \pm 8,23\text{M}$) e na “periodontite de progressão rápida” foram ($2,5 \pm 3,27 \mu\text{M}$).

Em relação aos valores de nitrito em pacientes com periodontite e a pacientes considerados periodontalmente saudáveis, os resultados deste estudo indicaram que os pacientes com doença periodontal apresentavam valores de concentração de nitrito mais elevados, tanto na saliva ($364 \pm 62 \mu\text{M}$) como no FCG ($4,7 \pm 0,8 \mu\text{M}$) comparando com os pacientes periodontalmente saudáveis, na saliva ($190 \pm 27 \mu\text{M}$) e no FCG ($3,3 \pm 0,3$

μM), o que vai de acordo com os resultados obtidos por estudos anteriores (Parwani et al., 2012; Reher et al., 2007; Sánchez et al., 2014; Topcu et al., 2014).

Este estudo piloto apresenta como limitações o facto de não só a amostra ser heterogénea, como a amostra em si ser relativamente pequena, limitando a análise estatística. Outro fator limitante foi o facto de os pacientes terem sido considerados como saudáveis, podendo esse diagnóstico periodontal ser incorreto, pois o mesmo não foi devidamente confirmado com um diagnóstico periodontal e realização de status radiográfico. Pode ainda ser apontado como limitante, a inclusão de variáveis como, *stress* psicológico, cansaço físico e ansiedade com significados particulares para cada participante, o que poderá levar a falsos positivos ou falsos negativos.

O protocolo de recolha das amostras deste estudo ainda não foi validado pela comunidade científica como sendo específico para a análise deste metabolito e posterior relação com a doença periodontal. Contudo, a recolha de saliva demonstrou ser uma técnica simples, com resultados promissores e de fácil análise. Por sua vez, a recolha de FCG teve os seus desafios e ainda necessita de um protocolo reformulado, pois o aumento de 1 tira de papel para 6 tiras de papel fez aumentar as variáveis relacionadas com esta recolha. Seria interessante em investigações futuras, recolher as amostras de FCG do mesmo local (mesial, oclusal, distal, palatino/ lingual) e do mesmo dente.

V. CONCLUSÕES

O óxido nítrico (NO) tem sido implicado na patogénese de uma ampla variedade de doenças inflamatórias, como a doença periodontal. Para além das suas ações fisiológicas benéficas e dependendo da sua concentração, este metabolito pode exercer uma ação citotóxica nos tecidos do hospedeiro e aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias.

A relação entre o NO e a doença periodontal é reconhecida, tendo sido sugerido como um potencial biomarcador da mesma. Porém, os mecanismos precisos não estão bem detalhados e a sua medição é dificultada pela sua instabilidade na presença de oxigénio, com consequente produção dos metabolitos nitrato e nitrito. Já este último, apresenta uma maior estabilidade e facilidade de medição, pelo que a sua proposta como potencial biomarcador da doença periodontal tem suscitado um interesse crescente.

Neste trabalho, foi implementado com sucesso um método de recolha de amostras de saliva para a deteção e quantificação de nitritos. Já no que diz respeito às amostras de FCG, o protocolo terá que ser futuramente otimizado, não só respeitante à recolha da amostra propriamente dita como também a fim de avaliar com rigor o volume total das mesmas.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo piloto, as concentrações de nitrito na saliva pareceram ter uma ligação com a severidade e a taxa de progressão da doença periodontal, observando-se concentrações mais elevadas de nitrito nos participantes com periodontite mais severa e com uma taxa de progressão mais elevada. No entanto, o reduzido tamanho da amostra, dita que estes resultados sejam interpretados com precaução. No futuro, seria importante desenvolver um estudo com uma amostra mais ampla e que seja viável do ponto de vista estatístico, de modo a permitir inferir possíveis correlações entre os níveis de nitrito e o estadió e grau da doença periodontal. Em caso positivo, seria possível implementar um novo método de diagnóstico da doença periodontal através de biomarcadores que possam detetar a presença da doença nas suas fases mais iniciais, determinar o seu grau de atividade e avaliar a resposta à terapia periodontal. Eventualmente, um estudo mais alargado permitiria ainda relacionar os

níveis de nitrito na saliva com outros fatores de interesse, como os hábitos alimentares e a hipertensão arterial.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Albandar, J. M. (2002). Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 29(1), 177–206. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.290109.x>
- Allaker, R. P., Silva Mendez, L. S., Hardie, J. M., & Benjamin, N. (2001). Antimicrobial effect of acidified nitrite on periodontal bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 16(4), 253–256. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302x.2001.160410.x>
- Ashworth, A., Mitchell, K., Blackwell, J. R., Vanhatalo, A., & Jones, A. M. (2015). High-nitrate vegetable diet increases plasma nitrate and nitrite concentrations and reduces blood pressure in healthy women. *Public Health Nutrition*, 18(14), 1–10. <https://doi.org/10.1017/S1368980015000038>
- Aurer, A., Aleksić, J., Ivić-Kardum, M., Aurer, J., & Culo, F. (2001). Nitric oxide synthesis is decreased in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(6), 565–568. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2001.028006565.x>
- Bachtiar, E. W., Putri, A. C., & Bachtiar, B. M. (2019). Salivary nitric oxide, Simplified Oral Hygiene Index, and salivary flow rate in smokers and non-smokers: a cross-sectional study. *F1000Research*, 8, 1–15. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20099.2>
- Barros, S. P., Williams, R., Offenbacher, S., & Morelli, T. (2016). Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontology 2000*, 70(1), 53–64. <https://doi.org/10.1111/prd.12107>
- Bejeh-Mir, A.P., Parsian, H., Akbari Khoram, M., Ghasemi, N., Bijani, A., & Khosravi-Samani, M. (2014). Diagnostic Role of Salivary and GCF Nitrite, Nitrate and Nitric Oxide to Distinguish Healthy Periodontium from Gingivitis and Periodontitis. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 3(3), 138–145. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25317400/>

- Bergstrom, J. (2014). Smoking rate and periodontal disease prevalence: 40-year trends in Sweden 1970–2010. *Journal of clinical periodontology*, *41*(10), 952–957. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12293>
- Bhakta, S. A., Borba, R., Taba, M., Jr, Garcia, C. D., & Carrilho, E. (2014). Determination of nitrite in saliva using microfluidic paper-based analytical devices. *Analytica Chimica Acta*, *809*, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.044>
- Bhatarai, K. R., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2018). Compliance with Saliva Collection Protocol in Healthy Volunteers: Strategies for Managing Risk and Errors. *International Journal of Medical Sciences*, *15*(8), 823–831. <https://doi.org/10.7150/ijms.25146>
- Borrell, L. N., & Crawford, N. D. (2012). Socioeconomic position indicators and periodontitis: examining the evidence. *Periodontology 2000*, *58*(1), 69–83. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00416.x>
- Bryan, N.S. (2016). Nitrites and Nitrates. *Encyclopedia of Food and Health*, 73–78. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00484-0>
- Carrizales-Sepúlveda, E. F., Ordaz-Farías, A., Vera-Pineda, R., & Flores-Ramírez, R. (2018). Periodontal Disease, Systemic Inflammation and the Risk of Cardiovascular Disease. *Heart, Lung and Circulation*, *27*(11), 1327–1334. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2018.05.102>
- Casanova, L., Hughes, F. J., & Preshaw, P. M. (2014). Diabetes and periodontal disease: a two-way relationship. *British Dental Journal*, *217*(8), 433–437. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.907>
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I., 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*, *45*(20), S1–S8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>

- Chami, V. D. O., Nunes, L., & Capelli, J. (2018). Expression of cytokines in gingival crevicular fluid associated with tooth movement induced by aligners: a pilot study. *Dental Press Journal of Orthodontics*, 23, 41-46. <https://doi.org/10.1590/2177-6709.23.5.041-046.oar>
- Cho, M. I., & Garant, P. R. (2000). Development and general structure of the periodontium. *Periodontology 2000*, 24(1), 9–27. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240102.x>
- Christiansen, L. N., Johnston, R. W., Kautter, D. A., Howard, J. W., & Aunan, W. J. (1973). Effect of nitrite and nitrate on toxin production by *Clostridium botulinum* and on nitrosamine formation in perishable canned comminuted cured meat. *Applied Microbiology*, 25(3), 357–362. <https://doi.org/10.1128/am.25.3.357-362.1973>
- Doel, J. J., Benjamin, N., Hector, M. P., Rogers, M., & Allaker, R. P. (2005). Evaluation of bacterial nitrate reduction in the human oral cavity. *European Journal of Oral Sciences*, 113(1), 14–19. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2004.00184.x>
- Fajardo-Gutiérrez, A. (2017). Medición en epidemiología: prevalencia, incidencia, riesgo, medidas de impacto. *Revista Alergia México*, 64(1), 109–120. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i1.252>
- Fine, D. H., Patil, A. G., & Loos, B. G. (2018). Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 89(1), S103–S119. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0712>
- Ghalayini, I. F. (2004). Nitric oxide-cyclic GMP pathway with some emphasis on cavernosal contractility. *International Journal of Impotence Research*, 16(6), 459–469. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3901256>

- Han, D. H., Kim, M. S., Shin, H. S., Park, K. P., & Kim, H. D. (2013). Association between periodontitis and salivary nitric oxide metabolites among community elderly Koreans. *Journal of Periodontology*, 84(6), 776–784. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120237>
- Hassell, T. M. (1993). Tissues and cells of the periodontium. *Periodontology 2000*, 3(1), 9–38. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1993.tb00230.x>
- Hord, N. G., Tang, Y., & Bryan, N. S. (2009). Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(1), 1–10. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27131>
- Hyde, E. R., Andrade, F., Vaksman, Z., Parthasarathy, K., Jiang, H., Parthasarathy, D. K., Torregrossa, A. C., Tribble, G., Kaplan, H. B., Petrosino, J. F., & Bryan, N. S. (2014). Metagenomic analysis of nitrate-reducing bacteria in the oral cavity: implications for nitric oxide homeostasis. *PloS ONE*, 9(3), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088645>
- Institute for Health Metrics and Evaluation. (2021). *Global Health Data Exchange Results Tool*. <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>
- Javaid, M. A., Ahmed, A. S., Durand, R., & Tran, S. D. (2016). Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(1), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.08.006>
- Jiang, N., Guo, W., Chen, M., Zheng, Y., Zhou, J., Kim, S. G., Embree, M. C., Songhee Song, K., Marao, H. F., & Mao, J. J. (2016). Periodontal Ligament and Alveolar Bone in Health and Adaptation: Tooth Movement. *Frontiers of oral biology*, 18, 1–8. <https://doi.org/10.1159/000351894>
- Johnson, G. K., & Hill, M. (2004). Cigarette smoking and the periodontal patient. *Journal of periodontology*, 75(2), 196–209. <https://doi.org/10.1902/jop.2004.75.2.196>

- Kapil, V., Rathod, K. S., Khambata, R. S., Bahra, M., Velmurugan, S., Purba, A., S Watson, D., Barnes, M. R., Wade, W. G., & Ahluwalia, A. (2018). Sex differences in the nitrate-nitrite-NO[•] pathway: Role of oral nitrate-reducing bacteria. *Free Radical Biology and Medicine*, 126, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.010>
- Karwowska, M., & Kononiuk, A. (2020). Nitrates/Nitrites in Food-Risk for Nitrosative Stress and Benefits. *Antioxidants*, 9(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/antiox9030241>
- Kassebaum, N. J., Smith, A., Bernabé, E., Fleming, T. D., Reynolds, A. E., Vos, T., Murray, C., Marcenes, W., & GBD 2015 Oral Health Collaborators (2017). Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *Journal of dental research*, 96(4), 380–387. <https://doi.org/10.1177/0022034517693566>
- Kharaeva, Z. F., Zhanimova, L. R., Mustafae, M., De Luca, C., Mayer, W., Chung Sheun Thai, J., Tiew Siok Tuan, R., & Korkina, L. G. (2016). Effects of Standardised Fermented Papaya Gel on Clinical Symptoms, Inflammatory Cytokines, and Nitric Oxide Metabolites in Patients with Chronic Periodontitis: An Open Randomised Clinical Study. *Hindawi*, 2016, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/9379840>
- Kingman, A., & Albandar, J. M. (2002). Methodological aspects of epidemiological studies of periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 29(1), 11-30. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.290102.x>
- Konttinen, Y. T., Platts, L. A., Tuominen, S., Eklund, K. K., Santavirta, N., Törnwall, J., Sorsa, T., Hukkanen, M., & Polak, J. M. (1997). Role of nitric oxide in Sjögren's syndrome. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 40(5), 875–883. <https://doi.org/10.1002/art.1780400515>

- Lee, Y. H., & Wong, D. T. (2009). Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *American Journal of Dentistry*, 22(4), 241–248. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19824562/>
- Lindhe, J., Karring, T., & Lang, N.P. (2003). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* (4ª edição). Blackwell Munksgaard. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4810851>
- Lohinai, Z. M., & Szabó, C. (1998). Role of nitric oxide in physiology and patophysiology of periodontal tissues. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 4(6), 1089-1095. https://www.researchgate.net/publication/315750723_Role_of_nitric_oxide_in_physiology_and_patophysiology_of_periodontal_tissues
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., & Gladwin, M. T. (2008). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(2), 156–167. <https://doi.org/10.1038/nrd2466>
- Ma, L., Hu, L., Feng, X., & Wang, S. (2018). Nitrate and Nitrite in Health and Disease. *Aging and Disease*, 9(5), 938–945. <https://doi.org/10.14336/AD.2017.1207>
- Machado, V., Botelho, J., Proença, L., Alves, R., Oliveira, M. J., Amaro, L., Águas, A., & Mendes, J. J. (2020). Periodontal status, perceived stress, diabetes mellitus and oral hygiene care on quality of life: a structural equation modelling analysis. *BMC Oral Health*, 20(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01219-y>
- Mayerhöfer, T. G., Pahlow, S., & Popp, J. (2020). The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure. *ChemPhysChem*, 21(18), 2029–2046. <https://doi.org/10.1002/cphc.202000464>
- McKnight, G. M., Smith, L. M., Drummond, R. S., Duncan, C. W., Golden, M., & Benjamin, N. (1997). Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut*, 40(2), 211–214. <https://doi.org/10.1136/gut.40.2.211>

- Menaka, K. B., Ramesh, A., Thomas, B., & Kumari, N. S. (2009). Estimation of nitric oxide as an inflammatory marker in periodontitis. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 13(2), 75–78. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.55842>
- Nanci, A., & Bosshardt, D. D. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000*, 40(1), 11–28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00141.x>
- Nazir, M. A. (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *International journal of health sciences*, 11(2), 72–80. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28539867/>
- Oliveira-Paula, G. H., & Tanus-Santos, J. E. (2019). Nitrite-stimulated Gastric Formation of S-nitrosothiols As An Antihypertensive Therapeutic Strategy. *Current drug targets*, 20(4), 431–443. <https://doi.org/10.2174/1389450119666180816120816>
- Ozmeric, N. (2004). Advances in periodontal disease markers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 343(1-2), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.01.022>
- 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., Loos, B. G., ... 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>
- Parwani, S. R., Chitnis, P. J., & Parwani, R. N. (2012). Salivary nitric oxide levels in inflammatory periodontal disease - a case-control and interventional study. *International Journal of Dental Hygiene*, 10(1), 67–73. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2011.00508.x>

- Qu, X. M., Wu, Z. F., Pang, B. X., Jin, L. Y., Qin, L. Z., & Wang, S. L. (2016). From Nitrate to Nitric Oxide: The Role of Salivary Glands and Oral Bacteria. *Journal of Dental Research*, 95(13), 1–5. <https://doi.org/10.1177/0022034516673019>
- Ramenzoni, L. L., Lehner, M. P., Kaufmann, M. E., Wiedemeier, D., Attin, T., & Schmidlin, P. R. (2021). Oral Diagnostic Methods for the Detection of Periodontal Disease. *Diagnostics*, 11(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11030571>
- Rammos, C., Hendgen-Cotta, U. B., Sobierajski, J., Bernard, A., Kelm, M., & Rassaf, T. (2014). Dietary nitrate reverses vascular dysfunction in older adults with moderately increased cardiovascular risk. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(15), 1584–1585. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.08.691>
- Ramos, L. A., Cavalheiro, C. C. S., & Cavalheiro, É. T. G. (2006). Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. *Química Nova*, 29(5), 1114-1120. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000500037>
- Reher, V. G., Zenóbio, E. G., Costa, F. O., Reher, P., & Soares, R. V. (2007). Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. *Journal of Oral Science*, 49(4), 271–276. <https://doi.org/10.2334/josnusd.49.271>
- Reners, M., & Brex, M. (2007). Stress and periodontal disease. *International Journal of Dental Hygiene*, 5(4), 199–204. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2007.00267.x>
- Rheu, G. B., Ji, S., Ryu, J. J., Lee, J. B., Shin, C., Lee, J. Y., Huh, J. B., & Shin, S. W. (2011). Risk assessment for clinical attachment loss of periodontal tissue in Korean adults. *The Journal of Advanced Prosthodontics*, 3(1), 25–32. <https://doi.org/10.4047/jap.2011.3.1.25>
- Sánchez, G. A., Miozza, V. A., Delgado, A., & Busch, L. (2014). Total salivary nitrates and nitrites in oral health and periodontal disease. *Journal of the Nitric Oxide Society*, 36, 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.10.012>

- Scarel-Caminaga, R. M., Cera, F. F., Pigossi, S. C., Finoti, L. S., Kim, Y. J., Viana, A. C., Secolin, R., Montenegro, M. F., Tanus-Santos, J. E., Orrico, S., & Cirelli, J. A. (2017). Inducible Nitric Oxide Synthase Polymorphisms and Nitric Oxide Levels in Individuals with Chronic Periodontitis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms18061128>
- Seymour, R. A. (2006). Effects of medications on the periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000*, 40(1), 120–129. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00137.x>
- Steffens, J. P., & Marcantonio, R. A. C. (2018). Classificação das doenças e condições periodontais e peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. *Revista de Odontologia da Universidade Estadual Paulista*, 47(4), 189-197. <https://doi.org/10.1590/1807-2577.04704>
- Sundar, N. M., Krishnan, V., Krishnaraj, S., Hemalatha, V. T., & Alam, M. N. (2013). Comparison of the salivary and the serum nitric oxide levels in chronic and aggressive periodontitis: a biochemical study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(6), 1223–1227. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5386.3068>
- Taylor, J. J., & Preshaw, P. M. (2016). Gingival crevicular fluid and saliva. *Periodontology 2000*, 70(1), 7–10. <https://doi.org/10.1111/prd.12118>
- Timby, N., Domellöf, M., Hernell, O., Lönnerdal, B., Nihlen, C., Johansson, I., & Weitzberg, E. (2020). Effects of age, sex and diet on salivary nitrate and nitrite in infants. *Journal of the Nitric Oxide Society*, 94, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.10.012>
- Topcu, A.O., Akalin, F. A., Sahbazoglu, K. B., Yamalik, N., Kilinc, K., Karabulut, E., & Tözüm, T. F. (2014). Nitrite and nitrate levels of gingival crevicular fluid and saliva in subjects with gingivitis and chronic periodontitis. *Journal of Oral & Maxillofacial Research*, 5(2), 1–10. <https://doi.org/10.5037/jomr.2014.5205>

- Tsikakos, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography. B*, 851(1-2), 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>
- Van Dyke, T. E., & Dave, S. (2005). Risk factors for periodontitis. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 7(1), 1–8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15736889/>
- Vishwakarma, A., Wany, A., Pandey, S., Bulle, M., Kumari, A., Kishorekumar, R., Igamberdiev, A. U., Mur, L., & Gupta, K. J. (2019). Current approaches to measure nitric oxide in plants. *Journal of Experimental Botany*, 70(17), 1–11. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz242>
- Wanchu, A., Khullar, M., Sud, A., & Bamberg, P. (2000). Elevated nitric oxide production in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clinical Rheumatology*, 19(5), 360–364. <https://doi.org/10.1007/s100670070028>
- Wang, Y., Huang, X., & He, F. (2019). Mechanism and role of nitric oxide signaling in periodontitis. *Experimental and therapeutic medicine*, 18(5), 3929–3935. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8044>
- Xia, D., Deng, D., & Wang, S. (2003). Alterations of nitrate and nitrite content in saliva, serum, and urine in patients with salivary dysfunction. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 32(2), 95–99. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0714.2003.00109.x>
- Zand, J., Lanza, F., Garg, H. K., & Bryan, N. S. (2011). All-natural nitrite and nitrate containing dietary supplement promotes nitric oxide production and reduces triglycerides in humans. *Nutrition Research*, 31(4), 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2011.03.008>
- Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., & Leung, S. W. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*, 129(2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002>

VII. ANEXOS

<i>Média da concentração de nitrito no FCG – recolha de fluido pelas PerioPaper® Gengival Fluid Collection Strips</i>	
Pacientes com periodontite	1393 µM
Pacientes periodontalmente saudáveis	8691 µM

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Mar 29, 2021

This Agreement between Miss. Ines Alves ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number 5038140622401

License date Mar 29, 2021

Licensed Content
Publisher John Wiley and Sons

Licensed Content
Publication Wiley Books

Licensed Content
Title Lindhe's Clinical Periodontology and Implant Dentistry, 7th Edition

Licensed Content
Author Mariano Sanz Niklaus P. Lang Tord Berglundh William V. Giannobile

Licensed Content
Date Sep 1, 2021

Licensed Content
Pages 1

Type of use Dissertation/Thesis

Requestor type University/Academic

Format Print and electronic



Proc. Interno nº 929

Ex.ma Senhora
Inês Soraia Alves

Monte de Caparica, 28 de janeiro 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 "Níveis de Nitrito na saliva e no fluido crevicular e a sua correlação com a severidade da Periodontite – um estudo piloto", foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Profª. Doutora Maria Fernanda de Mesquita

EGAS MONIZ – COOPERATIVA DE ENSINO SUPERIOR, CRL
Campus Universitário – Quinta da Granja – Monte de Caparica
2829-511 Caparica



Proc. Interno nº 929

Ex.ma Senhora
Inês Soraia Alves

Monte de Caparica, 6 de maio de 2021.

Ex.ma Senhora,

Em resposta às alterações do questionário que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, já aprovado em janeiro de 2021, com o tema denominado "Níveis de Nitrito na saliva e no fluido crevicular e a sua correlação com a severidade da Periodontite – um estudo piloto", informo que foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Profª. Doutora Maria Fernanda de Mesquita

EGAS MONIZ – COOPERATIVA DE ENSINO SUPERIOR, CRL
Campus Universitário – Quinta da Granja – Monte de Caparica
2829-511 Caparica

DECLARAÇÃO

Para os devidos efeitos se declara que nada há a opor a que a estudante Inês Soraia Avelãs Alves, do Mestrado Integrado em Medicina Dentária (IUEM), realize parte do trabalho experimental relativo ao Projecto de Investigação "Níveis de Nitrito na Saliva e no Fluido Crevicular e a sua Correlação com a Severidade da Periodontite - um Estudo Piloto", sob supervisão da Profª Doutora Maria Gabriela Almeida, no Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa, por um período com início em Janeiro de 2021 e duração prevista de 6 meses.

Campus de Caparica, 23 de Novembro de 2020

Presidente do Departamento de Química



Profª Doutora Susana Barreiros

Campus de Caparica
2829-116 CAPARICA

Tel. +351 21 294 8575
Fax +351 21 294 8550
m-dq@fct.unl.pt

www.fct.unl.pt



DECLARAÇÃO

Para os devidos efeitos se declara que a estudante Inês Soraia Avelãs Alves, do 5º ano Mestrado Integrado em Medicina Dentária (IUEM), irá realizar parte do trabalho experimental relativo ao Projecto de Investigação "Níveis de Nitrito na Saliva e no Fluido Crevicular e a sua Correlação com a Severidade da Periodontite - um Estudo Piloto", no Group of Biomarkers and Biosensors - GB2 (CiEM), sob minha supervisão, por um período com início em Janeiro de 2021 e duração prevista de 6 meses

ATENCIOSAMENTE,



26 NOVEMBRO 2020



Consentimento Informado
Código | WPEMPE.17_03

Monte da Caparica, ____ de ____ de 2021

Nº do questionário _____

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Dentária na Unidade Curricular de tese de mestrado do Instituto Universitário Egas Moniz, sob a orientação da Professora Doutora Maria Gabriela Almeida e do Professor Doutor Ricardo Almeida Castro Alves, solicita-se autorização para a participação no estudo "Níveis de Nitrito na Saliva e no Fluido Crevicular e a sua Correlação com a Severidade da Periodontite - um Estudo Piloto" a pacientes com e sem periodontite com o objetivo de comparar os níveis de nitrito na saliva e no fluido gengival crevicular (FCG) e ainda, avaliar a correlação entre os níveis de nitrito e os diferentes estadios da doença periodontal que consiste na seguinte participação: permissão de recolha de fluidos orais sendo estes, a saliva e fluido crevicular "produzido pela gengiva" e ainda um breve questionário sobre a saúde geral.

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

Este estudo pode trazer benefícios tais como uma melhor compreensão e avaliação do estado da periodontite e/ou exclusão da presença desta patologia ao progresso do conhecimento.

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

(Riscar o que não interessa)

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

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



Monte da Caparica, ____ de ____ de 2021

Nº do questionário: _____

Questionário:

1. É fumador/a?

<input type="checkbox"/>	Não, nunca fumei.
<input type="checkbox"/>	Não, mas sou ex-fumador/a. Foi fumador/a durante quanto tempo? _____ Há quanto tempo deixou de fumar? _____ Quantos cigarros fumava/dia? _____
<input type="checkbox"/>	Sim: É fumador/a há quanto tempo? _____ Quantos cigarros fuma/dia? _____

2. Costuma ingerir bebidas alcoólicas?

<input type="checkbox"/>	Não.
<input type="checkbox"/>	Sim. <input type="checkbox"/> Raramente (1 a 2 vezes/mês) <input type="checkbox"/> Ocasionalmente (3 a 4 vezes/mês) <input type="checkbox"/> Frequentemente (várias vezes por semana)

3. Qual a quantidade de água ingerida diariamente?

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

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

NÃO.
<p>Sim. Ingere habitualmente (3 a 4 vezes por semana), algum destes vegetais?</p> <p><input type="checkbox"/> < 1 chávena de \approx 120 g de espinafres não cozinhados. <input type="checkbox"/> \geq 1 chávena de \approx 120g de espinafres não cozinhados.</p> <p><input type="checkbox"/> < 1 chávena de \approx 120 g de beterraba. <input type="checkbox"/> \geq 1 chávena de \approx 120g de beterraba.</p> <p><input type="checkbox"/> < 1/2 chávena de \approx 120 g de couve. <input type="checkbox"/> \geq 1/2 chávena de \approx 120g de couve.</p> <p><input type="checkbox"/> < 1/2 chávena de \approx 120 g de sumo vegetal. <input type="checkbox"/> \geq 1/2 chávena de \approx 120g de sumo vegetal.</p> <p><input type="checkbox"/> < 1/2 chávena de \approx 120 g de sumo de romã. <input type="checkbox"/> \geq 1/2 chávena de \approx 120 g de sumo de romã.</p> <p><input type="checkbox"/> 1 banana média. <input type="checkbox"/> > do que 1 banana média.</p> <p><input type="checkbox"/> 1 laranja média. <input type="checkbox"/> > do que 1 laranja média.</p> <p>Outros _____</p>

5. Costuma ter uma dieta rica em carnes processadas?

NÃO.
<p>Sim. Ingere habitualmente (3 a 4 vezes por semana), alguma destas carnes processadas?</p> <p><input type="checkbox"/> < 30 g de bacon (\approx de 3 fatias de 10 g). <input type="checkbox"/> \geq 30 g de bacon (\approx de 3 fatias de 10 g).</p> <p><input type="checkbox"/> < 60 g de fiambre (\approx de 3 fatias de 20 g). <input type="checkbox"/> \geq 60 g de fiambre (\approx de 3 fatias de 20 g).</p> <p><input type="checkbox"/> < 75 g de salsichas (\approx de 3 salsichas de 25 g). <input type="checkbox"/> \geq 75 g de salsichas (\approx de 3 salsichas de 25 g).</p> <p>Outros _____</p>

2 de 3

6. Está a fazer alguma suplementação vitamínica?

Não. Se sim, qual? _____

7. Tem sensação de boca seca?

Não. Sim.

8. Considera que tem uma elevada quantidade de stress psicológico, cansaço físico ou ansiedade na sua vida?

	Stress psicológico
	Cansaço físico
	Ansiedade



Requerimento à Comissão de Ética da Egas Moniz

Código | IMP.EM.PE.18_02

Exmo.(a). Sr.(a) Presidente da Comissão de Ética,

No âmbito da tese de Mestrado do curso de Medicina Dentária, eu, Inês Soraia Avelãs Alves, venho por este meio solicitar o parecer da Comissão de Ética da Egas de Moniz para a realização de um trabalho com o tema "Níveis de Nitrito na Saliva e no Fluido Crevicular e a sua Correlação com a Severidade da Periodontite - um Estudo Piloto".

Este trabalho tem como objetivos comparar os níveis de nitrito na saliva e no fluido gengival crevicular (FCG) em pacientes com e sem periodontite e ainda, avaliar a correlação entre os níveis de nitrito e os diferentes estádios da doença periodontal e será supervisionado por Prof. Associada Maria Gabriela Almeida, e assistido por Prof. Auxiliar Ricardo Almeida Castro Alves.

Monte de Caparica, [dia] de Janeiro de 2021

Pede deferimento.

Atentamente,



Requerimento à Comissão de Ética da Egas Moniz

Código | IMP.EM.PE.18_02

Exmo.(a). Sr.(a) Presidente da Comissão de Ética,

No âmbito da tese de Mestrado do curso de Medicina Dentária, eu, Inês Soraia Avelãs Alves, venho por este meio solicitar um segundo parecer da Comissão de Ética da Egas de Moniz para a realização de um trabalho com o tema "Níveis de Nitrito na Saliva e no Fluido Crevicular e a sua Correlação com a Severidade da Periodontite - um Estudo Piloto".

Após aprofundarmos ainda mais o nosso conhecimento sobre o trabalho que estamos a realizar, eu, a Prof. Associada Maria Gabriela Almeida e o Prof. Auxiliar Ricardo Almeida Castro Alves achámos necessário acrescentar e especificar mais as questões que se encontram no questionário que será feito aos pacientes incluídos no estudo. As questões alteradas foram a 1.; 2.; 3.; 4.; 5.; 6. e 8.

O estudo já foi previamente aprovado - número do processo interno :929 e a data de aprovação: 28 de Janeiro de 2021

Monte de Caparica, 22 de Abril de 2021

Pede deferimento.

Atentamente,

Inês Soraia Avelãs Alves.



Declaração da Direção Clínica para Autorização para realização de trabalho de projeto final do Mestrado Integrado em Medicina Dentária na Clínica Dentária Egas Moniz

Código | IMP.CDEM.05_01

Identificação do Estudante: Inês Soraia Avelãs Alves

Título do Trabalho: Níveis de Nitrito na Saliva e no Fluido Crevicular e a sua Correlação com a Severidade da Periodontite - um Estudo Piloto

Excelentíssima Professora Doutora Fernanda de Mesquita,

A aluna Inês Soraia Avelãs Alves, pode utilizar a Clínica Dentária Egas Moniz (CDEM), para realização da investigação - Níveis de Nitrito na Saliva e no Fluido Crevicular e a sua Correlação com a Severidade da Periodontite - um Estudo Piloto.

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

A consulta dos processos clínicos somente poderá ser efetuada na CDEM, dentro de horário a estipular para cada projeto.

Atenciosamente, com os melhores cumprimentos,

Monte da Caparica, de de

Direção Clínica