

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

AS METALOPROTEINASES MMP-8 E MMP-9 NO FLUÍDO CREVICULAR DE INDIVÍDUOS COM DOENÇA PERIODONTAL

Trabalho submetido por

Yohan Ragné

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

junho de 2025

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

AS METALOPROTEINASES MMP-8 E MMP-9 NO FLUÍDO CREVICULAR DE INDIVÍDUOS COM DOENÇA PERIODONTAL

Trabalho submetido por

Yohan Ragné

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

Prof. Doutora Madalena Oom

E coorientado por

Prof. Doutor Ricardo Alves

junho de 2025

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª. Doutora Madalena Oom, o meu mais sincero agradecimento por ter aceite acompanhar-me neste último percurso rumo à conclusão do curso. Agradeço todo o apoio e disponibilidade ao longo desta etapa, bem como o conhecimento transmitido ao longo de toda a formação

Ao meu coorientador, Prof. Doutor Ricardo Alves, agradeço toda a disponibilidade, atenção e contributos valiosos que permitiram enriquecer esta tese.

Agradeço a todos os professores e ao pessoal do Instituto Universitário Egas Moniz pelo ensino e apoio durante estes anos.

À Prof^ª. Doutora Ana Clara Ribeiro e ao Paulo Mascarenhas, pelo seus conhecimentos, disponibilidade e ajuda.

Agradeço também aos meus colegas e amigos pela ajuda, boa disposição e partilha de conhecimentos ao longo deste percurso.

Por fim, expresso a minha profunda gratidão à minha família pelo apoio constante, paciência e incentivo.

RESUMO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica e multifatorial, frequentemente diagnosticada tardiamente, quando a destruição dos tecidos de suporte já se iniciou. A progressão da doença pode estar associada a polimorfismos em genes que codificam de proteínas envolvidas na degradação do ligamento periodontal como as metalopeptidases da matriz (MMP). Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), particularmente nas regiões promotoras, podem influenciar a expressão genética e nos níveis de proteína. Vários estudos examinaram a correlação entre SNP nos promotores de MMP-8 e MMP-9, juntamente com os níveis da enzima MMP-8, e o risco de desenvolver periodontite. No entanto, os resultados permanecem inconclusivos.

Este estudo teve como objetivo investigar a associação entre os polimorfismos MMP-8 -799C>T, MMP-8 +17C>G e MMP-9 -1562C>T e os níveis das enzimas MMP-8 no fluido gengival crevicular (FGC) com a doença periodontal, avaliando o seu potencial como biomarcadores para o diagnóstico precoce da periodontite. A amostra do estudo foi composta por 62 indivíduos, dos quais 36 com diagnóstico de periodontite e 26 com tecido periodontal saudável. As amostras de FGC foram recolhidas com tiras de papel, sendo as concentrações enzimáticas medidas por ELISA e a atividade por zimografia. A análise genética foi realizada através de PCR e RFLP, seguida de eletroforese. Foram utilizados modelos lineares generalizados (distribuição gama, ligação log) para analisar os dados com distribuição não normal.

Os resultados do estudo não demonstraram uma associação estatisticamente significativa entre os polimorfismos estudados ou os níveis de MMP-8 com a presença de periodontite quando ajustados à idade. Apenas a idade demonstrou uma correlação negativa com os níveis de MMP-8 e a presença de periodontite. Apesar da reduzida dimensão da amostra os dados corroboram a evidência que questiona a eficácia da MMP-8 como biomarcador diagnóstico isolado para a periodontite sugerindo a necessidade de incluir outras MMP em futuras investigações.

Palavras-chave :

Biomarcador; Fluido Crevicular Gengival; Metallo; Periodontite

ABSTRACT

Periodontitis is a chronic, multifactorial inflammatory disease that is frequently diagnosed at a late stage, when the destruction of supporting tissues has already begun. Its progression may be related to polymorphisms in genes encoding proteins involved in the degradation of the periodontal ligament, such as matrix metalloproteinases (MMPs). Single nucleotide polymorphisms (SNPs), particularly those in promoter regions, have been demonstrated to influence on gene expression and protein levels. A number of studies have examined the correlation between SNPs in the promoters of MMP-8 and MMP-9, along with the levels of the MMP-8 enzyme, and the risk of developing periodontitis. However, the results remain inconclusive.

This study aimed to investigate the association between the MMP-8 polymorphisms (-799C>T, +17C>G) and MMP-9 (-1562C>T) and the levels of the MMP-8 enzyme in gingival crevicular fluid (FGC) with periodontal disease, evaluating their potential as biomarkers for the early diagnosis of periodontitis. The study population comprised 62 individuals with 36 diagnosed with periodontitis and 26 exhibiting healthy periodontal tissues. The collection of FGC samples was accomplished using paper strips, enzyme concentrations were measured by ELISA, and enzyme activity was assessed by zymography. Genetic analysis was performed using PCR and RFLP, followed by electrophoresis. Generalised linear models (gamma distribution, log link) were used to analyse data with a non-normal distribution.

The results demonstrated an absence of a significant association between the studied polymorphisms or MMP-8 levels and the presence of periodontitis. Only age was associated with lower MMP-8 levels or the presence of periodontitis. Despite the limited sample size, the data substantiate the existing evidence questioning the efficacy of MMP-8 as a standalone diagnostic biomarker for periodontitis, underscoring the need to include other MMPs in subsequent investigations.

Keywords :

Biomarker; Gingival Crevicular Fluid; Metalloproteinase; Periodontitis

ÍNDICE GERAL

I. Introdução.....	13
1. Doença periodontal	13
1.1 Definição	13
1.2 Epidemiologia e fatores de riscos.....	14
1.3 Classificação.....	15
1.4 Patogénese da periodontite.....	17
2. MMP e o seu papel na periodontite.....	19
2.1 Geral.....	19
2.1 Estrutura	19
2.2 Ativação e regulação	22
2.3 MMP-8 e MMP-9.....	24
2.3.1 MMP-8	24
2.3.2 MMP-9	26
2.4 Papel da MMP-8 e MMP-9 na degradação dos tecidos periodontais	26
2.5 Polimorfismos de nucleótido único nas regiões promotoras dos genes MMP-8 e MMP-9	28
3. MMP-8 e MMP-9 como biomarcadores	28
4. Objetivos e hipóteses.....	29
II. Materiais e métodos	31
5. Considerações gerais	31
6. Estudo clínico.....	31
6.1 Seleção da Amostra	31
6.2 Recolha de fluido crevicular gengival.....	32
6.3 Quantificação do fluido crevicular gengival	33
6.4 Preparação de amostras para análise	33
6.5 Análise da atividade das MMP por zimografia	33
6.6 Quantificação de MMP-8 por ELISA	35
6.7 Recolha de material genético	36
6.8 Extração de ADN	36
6.9 Técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)	37

6.10	Análise dos polimorfismos MMP-8 ⁻⁷⁹⁹ , MMP-8 ⁽⁺¹⁷⁾ e MMP-9 ⁻¹⁵⁹² por Polimorfismo de tamanho de Fragmentos de Restrição (RFLP).....	41
III.	Resultados	45
7.	População estudada	45
8.	Genotipagem dos promotores dos genes MMP-8 e MMP-9	46
9.	Presença de MMP-8 no FCG	48
10.	Revelação das MMP ativas presentes no FCG.....	50
IV.	Discussão	53
V.	Conclusão	57
VI.	Bibliografia	59
VII.	Anexos	69

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 COMPARAÇÃO ENTRE O PERIODONTO SAUDÁVEL E O PERIODONTO AFETADO PELA PERIODONTITE. ILUSTRAÇÃO PRÓPRIA.....	14
FIGURA 2 DIAGRAMA DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DENTÁRIO POR COLONIZADORES PRECOCES E TARDIOS, ADAPTADA DE (13). ILUSTRAÇÃO PRÓPRIA.	18
FIGURA 3 CLASSIFICAÇÃO DAS MMP ADAPTADA DA TABELA DE (20). ILUSTRAÇÃO PRÓPRIA. ..	21
FIGURA 4 ORGANIZAÇÃO GERAL DO DOMÍNIO DAS MMP. ILUSTRAÇÃO PRÓPRIA.	22
FIGURA 5 ORGANIZAÇÃO GERAL DO DOMÍNIO DAS MMP, AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO DO PRÓ- PÉPTIDO. ILUSTRAÇÃO PRÓPRIA.....	23
FIGURA 6 ESTADOS DE ATIVAÇÃO, ADAPTADO DE (25). ILUSTRAÇÃO PRÓPRIA.....	24
FIGURA 7 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO PERIODONTO. ILUSTRAÇÃO PRÓPRIA.	27
FIGURA 8 NZYCOLOUR PROTEIN MARKER I, NZYTECH®.....	34
FIGURA 9 REPRESENTAÇÃO DE UM DOS GEL UTILIZADO. ILUSTRAÇÃO PRÓPRIA.	34
FIGURA 10 CURVA DE CALIBRAÇÃO USADA NA ANÁLISE DAS MASSAS MOLECULARES	35
FIGURA 11 A E B REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS DAS EQUAÇÕES OBTIDAS PARA A REGRESSÃO NÃO LINEAR 4PL DA MMP-8. CURVAS GERADAS COM O SOFTWARE MYCURVEFIT®.	35
FIGURA 12 OMNISWAB, ESTÉRIL (100), WHATMAN FTA QIAGEN®	36
FIGURA 13 NZYDNA LADDER VI	43
FIGURA 14 EXEMPLO DE RESULTADOS DA ELETROFORESE DOS PRODUTOS PCR APÓS A TÉCNICA PCR-RFLP PARA AS 8 AMOSTRAS EM FALTA RELATIVAMENTE AOS POLIMORFISMOS MMP-8- 799 (C/T)	46
FIGURA 15 DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DO MMP-8 -799(C/T) NA POPULAÇÃO ESTUDADA.	47
FIGURA 16 DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DO MMP-8 +17(C/G) NA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	47
FIGURA 17 DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DO MMP-9 -1562(C/T) NA POPULAÇÃO ESTUDADA.	47
FIGURA 18 CONCENTRAÇÃO DE MMP-8 POR ESTÁDIO DA DOENÇA.....	50
FIGURA 19 RESULTADO DO GEL DE ZIMOGRÁFIA. A,- GEL DE ZIMOGRÁFIA B,- A ANÁLISE QUE SE SEGUIU COM O SOFTWARE FIJI UM TRAÇO INDICA A NÃO DETECÇÃO DESSA BANDA.....	51

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 CLASSIFICAÇÃO ATUAL DOS ESTÁDIOS DA DOENÇA PERIODONTAL, ADAPTADO DE (3).	16
TABELA 2 CLASSIFICAÇÃO ATUAL DOS GRAUS DE GRAVIDADE DA DOENÇA PERIODONTAL, ADAPTADA DE(3)	17
TABELA 3 RESUMO DOS INICIADORES, CONDIÇÕES DE PCR E ENZIMAS DE RESTRIÇÃO PARA OS POLIMORFISMOS MMP-8 E MMP-9	39
TABELA 4 PREPARAÇÃO DE CADA TUBO PCR	40
TABELA 5 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA DISCRIMINAÇÃO DE ALELOS UTILIZANDO A TÉCNICA RFLP	42
TABELA 6 CARATERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DA POPULAÇÃO GERAL ESTUDADA	45
TABELA 7 CARATERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DA POPULAÇÃO DOS DOIS GRUPOS	45
TABELA 8 RESULTADOS DOS 8 ANÁLISES GENÉTICAS	46
TABELA 9 RESUMO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS A PERIODONTITE.	48
TABELA 10 CONCENTRAÇÃO DE MMP-8 NO FGC PARA AS 36 AMOSTRAS QUANTIFICADAS NESTE TRABALHO	49
TABELA 11 CONCENTRAÇÃO TOTAL DE MMP-8 (g/ML) NO FGC	49
TABELA 12 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL EM CADA UM DOS GRUPOS USADOS PARA ZIMOGRAFIA	51

LISTA DE SIGLAS

AAP – American Academy of Periodontology (Associação Americana de Periodontologia)

aMMP-8 – Metalopeptidase-8 ativa

CAL – Clinical Attachment Loss (Perda de Inserção Clínica)

CDEM – Clínica Dentária Egas Moniz

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EFP – European Federation of Periodontology (Federação Europeia de Periodontologia)

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FCG – Fluido Crevicular Gengival

LPD – Ligamento Periodontal

LPS – Lipopolissacarídeos

MEC – Matriz Extracelular

MMP – Metalopeptidase da Matriz Extracelular

MT-MMP – Metalopeptidases do Tipo de Membrana

MV – Mésio-Vestibular

PBS – Tampão Fosfato Salino

PGE2 – Prostaglandina E2

PMN – Leucócitos Polimorfonucleares (Neutrófilos)

PRO-MMP – Pró-Metalopeptidase

PS – Profundidade de Sondagem

ROS - espécies reativas de oxigênio

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

TIMP – Inibidor Tecidual de Metalopeptidases

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TPS – Terapia de Suporte Periodontal

UA – Unidade Arbitrária

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

OMS – Organização Mundial da Saúde

I. Introdução

A saúde oral desempenha um papel essencial no bem-estar geral, influenciando diretamente funções básicas como a mastigação, a fala e a estética, além de contribuir significativamente para a qualidade de vida dos indivíduos. Entre os desafios mais relevantes enfrentados na prática clínica e na investigação em medicina dentária, destacam-se as doenças periodontais pela sua elevada prevalência e pelo impacto duradouro que podem ter na saúde oral e sistêmica (1,2).

De natureza inflamatória e multifatorial, estas patologias envolvem uma complexa interação entre fatores microbianos, resposta imune do hospedeiro e predisposição genética. Muitas vezes assintomáticas nas fases iniciais, podem evoluir de forma silenciosa, dificultando o diagnóstico precoce e comprometendo a eficácia do tratamento (3,4). Dado o seu potencial de progressão e os efeitos adversos que podem gerar a longo prazo, o estudo aprofundado da sua origem, dos mecanismos envolvidos e dos marcadores associados tornou-se uma prioridade em saúde pública e um campo de investigação particularmente relevante.

Neste contexto, torna-se essencial compreender de forma clara o que são as doenças periodontais, como se manifestam e quais os fatores que influenciam o seu desenvolvimento e progressão.

1. Doença periodontal

1.1 Definição

A doença periodontal é uma infecção bacteriana e multifatorial que se manifesta inicialmente como uma inflamação dos tecidos moles e duros do periodonto, designada de gengivite e que, pode progredir para periodontite, caracterizada por ser um estado avançado e crónico que leva à destruição permanente dos tecidos de suporte do dente. (3,5).

O periodonto, que inclui a gengiva, o ligamento periodontal (LPD), o cemento radicular e o osso alveolar é uma estrutura biológica dinâmica, sujeita a alterações morfológicas e funcionais dentro da cavidade oral sob a influência de vários fatores locais, ambientais e sistémicos. A sua principal função é a manutenção do dente e da superfície da mucosa oral (6). A Figura 1 apresenta um esquema que ilustra a diferença entre um periodonto saudável e um periodonto reduzido.

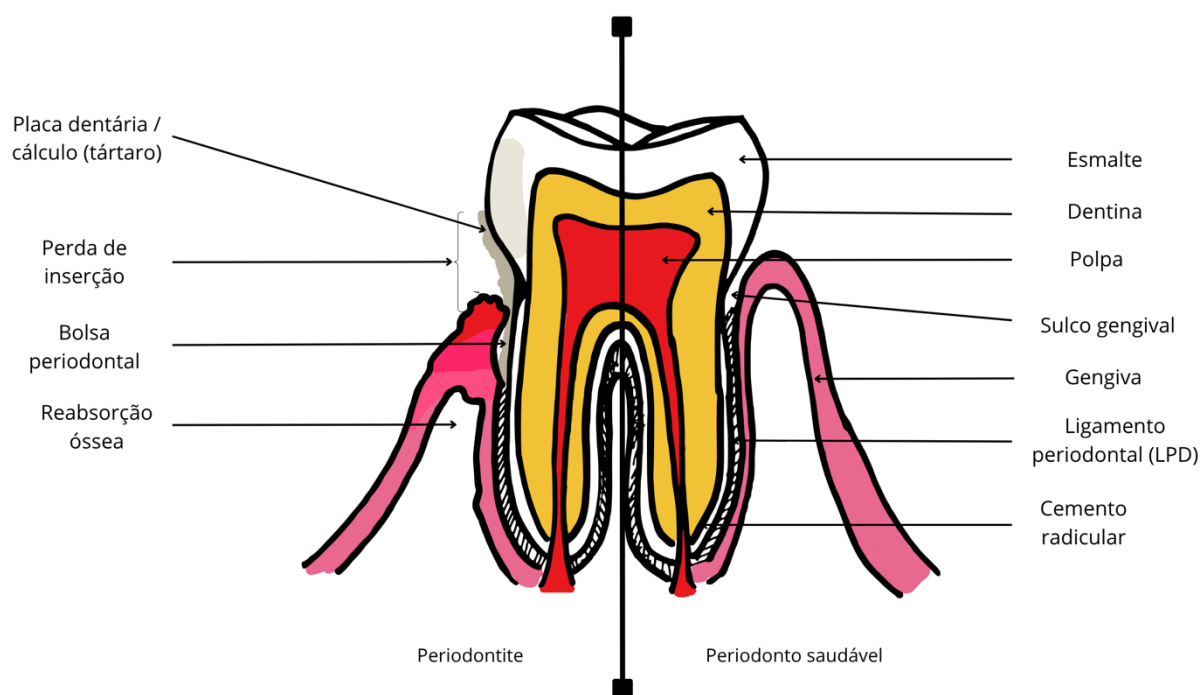


Figura 1 Comparação entre o periodonto saudável e o periodonto afetado pela periodontite. Ilustração própria.

A matriz extracelular (MEC) do periodonto é uma rede tridimensional composta por colágenos, proteoglicanos, glicoproteínas, água e minerais como a hidroxiapatita (7). A MEC sustenta os tecidos periodontais e garante sua integridade estrutural e funcional. Cada tecido possui uma composição específica: na gengiva e no ligamento predominam o colágeno I e III enquanto o cimento e o osso contêm matriz mineralizada rica em colágeno I (7).

1.2 Epidemiologia e fatores de riscos

De acordo com o último relatório global da Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre o estado da saúde oral, a doença periodontal grave é um problema de saúde pública que afeta quase 19% da população, ou seja, mil milhões de pessoas. Em 2022, a região do mundo mais afetada era África, com uma prevalência de quase 23% dos indivíduos com 15 ou mais anos. Em 2022, em Portugal, a prevalência é de 7,3% (4).

A OMS afirma no seu relatório que as doenças orais têm muito em comum com outras doenças não transmissíveis, partilhando fatores de risco que, na maioria dos casos, podem ser evitados como é o caso do consumo excessivo de açúcares, o tabagismo ou o uso nocivo de álcool. A idade avançada é também um aspeto importante a ter em conta, uma vez que estas doenças tendem a evoluir de forma lenta, acumulando-se e agravando-se ao longo da vida (4).

A doença periodontal engloba uma série de condições, algumas das quais estão relacionadas com o biofilme da placa bacteriana, enquanto outras são independentes deste. A acumulação de biofilme pode ou não desempenhar um papel na progressão de cada uma destas condições (5,8).

1.3 Classificação

A nova classificação das doenças periodontais e peri-implantares, adotada pela Academia Americana de Periodontologia (AAP) e pela Federação Europeia de Periodontologia (EFP) em 2017, substitui a classificação de 1999 e apresenta uma categorização mais precisa das doenças periodontais (3). Nesta classificação, a hemorragia à sondagem foi identificada como o principal critério de diagnóstico da gengivite, uma inflamação reversível da gengiva causada, na maioria dos casos, pela acumulação de biofilme dentário, que, se não tratada, pode progredir para periodontite. Assim na ausência deste sinal clínico, o periodonto é considerado clinicamente saudável (8).

A definição de saúde periodontal foi clarificada para incluir não só um periodonto intacto, mas também um periodonto reduzido, ou seja, um periodonto que sofreu perda de inserção e reabsorção óssea após um tratamento periodontal bem-sucedido. Nestes pacientes, a ausência de inflamação e hemorragia à sondagem continua a ser o critério determinante da estabilidade periodontal (3,8).

Ao contrário dos pacientes com gengivite, que podem regressar a um estado de saúde periodontal completo, um paciente que tenha desenvolvido periodontite permanece um paciente periodontal para toda a vida, mesmo após um tratamento eficaz. Isto implica um acompanhamento regular e cuidados de suporte a longo prazo, destinados a prevenir a reativação da doença e a manter o equilíbrio microbiano e inflamatório do periodonto (3,8).

A periodontite é atualmente classificada de acordo com estádios e graus, permitindo uma avaliação detalhada da gravidade e da progressão da doença (5) como se resume na tabela 1 e 2.

Tabela 1 Classificação atual dos estádios da doença periodontal, adaptado de (3).

Estádio	Descrição	Principais características
I	Periodontite inicial	- Perda clínica de ligação (CAL) de 1 a 2 mm - Profundidade do bolso ≤ 4 mm - Sem perda óssea interproximal ou perda óssea horizontal ligeira
II	Periodontite moderada	- CAL de 3 a 4 mm - Profundidade do bolso ≤ 5 mm - Perda óssea horizontal que não ultrapasse o terço médio da raiz
III	Periodontite grave com potencial perda de dentes	- CAL ≥ 5 mm - Perda óssea que se estende até ao terço médio ou apical da raiz - Profundidade do bolso ≥ 6 mm - Perda de até 4 dentes devido a periodontite - Possível envolvimento da furca e mobilidade dentária moderada
IV	Periodontite avançada com elevado risco de perda de dentes e necessidades de reabilitação complexas	- Critérios da fase III - Perda de 5 ou mais dentes devido a periodontite - Disfunção mastigatória - Migração dentária grave - Necessidades complexas de reabilitação

Tabela 2 Classificação atual dos graus de gravidade da doença periodontal, adaptada de(3)

Grau	Progressão da doença	Fatores de risco e considerações sistêmicas
A	Progresso lento	- Sem perda de fixação ou perda óssea ao longo de 5 anos - Baixa percentagem de sítios afetados - Sem fatores de risco importantes
B	Progressos moderados	- Perda de inserção ou perda óssea < 2 mm ao longo de 5 anos - Destruição dos tecidos em função da quantidade de placa - Presença de fatores de risco moderados (por exemplo, fumador de menos de 10 cigarros/dia, diabetes com HbA1c $< 7\%$)
C	Progressos rápidos	- Perda de fixação ou perda óssea ≥ 2 mm ao longo de 5 anos - Destruição de tecido superior às expectativas em relação à quantidade de placa - Presença de fatores de risco significativos (por exemplo, fumador de mais de 10 cigarros/dia, diabetes com HbA1c $\geq 7\%$)

1.4 Patogénese da periodontite

A patogénese da periodontite é um processo multifatorial, em que fatores microbianos, imunitários e ambientais contribuem para a destruição dos tecidos periodontais. A acumulação de biofilme dentário, composto por uma complexa comunidade bacteriana, é central no desenvolvimento da doença. Este biofilme é formado por diversas espécies bacterianas, incluindo *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*, que aderem à superfície dentária após a formação de uma película de proteínas salivares (9,10). Com o tempo, o biofilme diversifica-se e inclui bactérias anaeróbias estritos, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, que estão fortemente associados à periodontite (9,10). A produção de uma matriz rica em polissacáridos, proteínas e lípidos reforça a estrutura do biofilme, protegendo as bactérias e favorecendo a sua resistência aos antimicrobianos (11,12). A

composição do biofilme muda ao longo do tempo e é influenciada por fatores ambientais, em particular a dieta e a higiene oral. Essa diversificação do biofilme está descrito na figura 2.

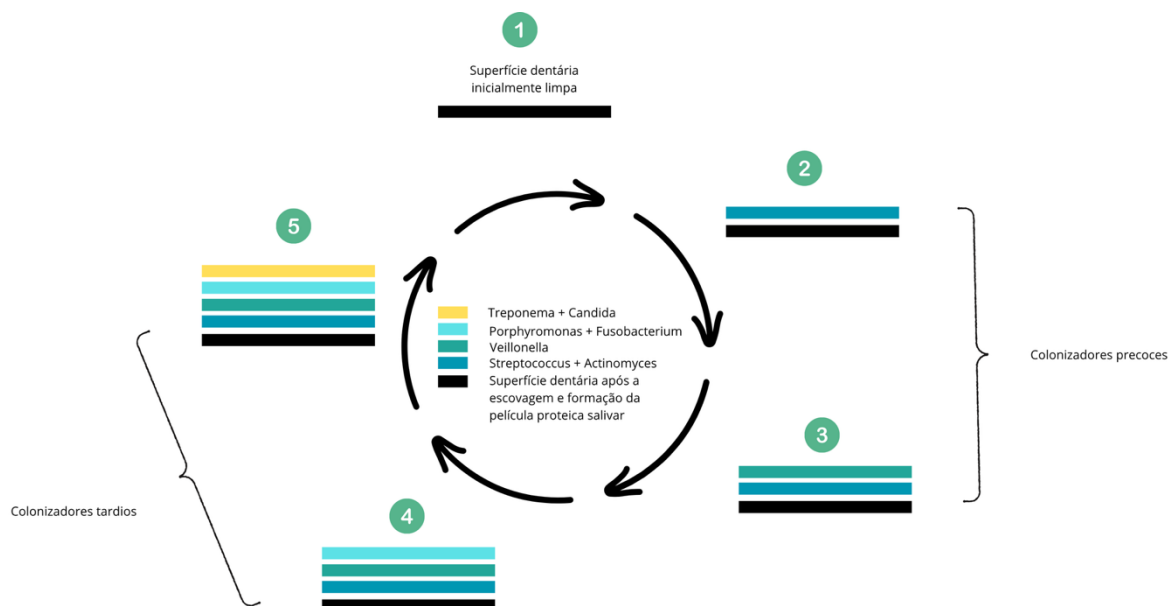


Figura 2 Diagrama da formação de biofilme dentário por colonizadores precoces e tardios, adaptada de (13). Ilustração própria.

Quando o biofilme se acumula na região subgengival e se estende para o sulco gengival, ele altera o ambiente local, tornando-o mais anaeróbico, o que favorece a colonização de bactérias patogênicas. A resposta imunitária do hospedeiro, incluindo o recrutamento de neutrófilos e macrófagos, leva à ativação de mediadores inflamatórios, entre os quais as metalopeptidases da matriz, que promovem a degradação da matriz extracelular. Uma resposta inflamatória mais exacerbada pode levar à destruição dos tecidos de suporte, resultando na perda óssea e no enfraquecimento do ligamento periodontal (12).

Fatores como o tabagismo, têm um impacto significativo nesta dinâmica. O tabagismo, por exemplo, altera a resposta imunitária, reduz a capacidade de regeneração dos tecidos e aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo assim para uma progressão mais rápida da periodontite (14).

Esta visão multifatorial sublinha a importância de uma abordagem terapêutica global para prevenir e tratar a periodontite.

2. MMP e o seu papel na periodontite

2.1 Geral

Em 1962, foi observada pela primeira vez a atividade colagenolítica ao estudar os tecidos de girinos em crescimento (15). Esta descoberta lançou a investigação sobre as primeiras metalopeptidases da matriz (MMP). Atualmente sabemos que estas enzimas desempenham um papel central na remodelação dos tecidos, degradando colagénio e outros componentes da MEC.

As MMP são uma família multigénica de endopeptidases dependentes do zinco que desempenham um papel fundamental na degradação, reparação e remodelação da MEC (16). Estão envolvidas em processos essenciais como o desenvolvimento embrionário, a cicatrização de feridas e a regeneração de tecidos. No entanto, quando a sua atividade é desregulada, as MMP podem alterar as estruturas da MEC e modificar certas interações celulares, contribuindo assim para várias patologias, incluindo cancro, doenças degenerativas e doenças inflamatórias (17). A compreensão do seu funcionamento e regulação é, portanto, essencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

A primeira colagenase humana foi descoberta em 1975, a partir de sinóvia reumatoide (18). E, seriam necessários mais 11 anos para que fosse deduzida a estrutura primária de uma colagenase humana produzida por fibroblastos (MMP-1) por clonagem do cDNA (19). Atualmente, estão identificadas 23 MMP humanas (20), que podem ser classificadas em vários grupos como ilustrado na Figura 3. As principais classes de MMP são as colagenases, que degradam o colagénio; as gelatinases, que atuam em substratos de gelatina; as estromelisinases, que têm uma ampla especificidade; as matrilisinas, que clivam proteínas da matriz, como por exemplo a fibronectina; e as MMP de tipo membranar, ancoradas na superfície celular. As enzimas "não conformes" descobertas mais recentemente estão agrupadas na categoria "outras" (20,21).

2.1 Estrutura

As MMP são geralmente constituídas por quatro domínios distintos, como ilustrado na Figura 4: um péptido sinal N-terminal, que guia a enzima para o retículo endoplasmático rugoso durante a síntese, um pró-peptídeo (ou pródomínio) que mantém a latência destas enzimas até que um fator externo intervenha para as ativar, um domínio catalítico (CAT) que aloja o ião zinco (Zn^{2+}) e é responsável pela atividade enzimática (170 aminoácidos), um domínio C-

terminal do tipo hemopexina (HPX) que determina a especificidade do substrato da MMP (200 aminoácidos) e uma pequena região de charneira, que permite à região HPX, quando a enzima é ativada, apresentar o substrato ao domínio catalítico (16,17,20).

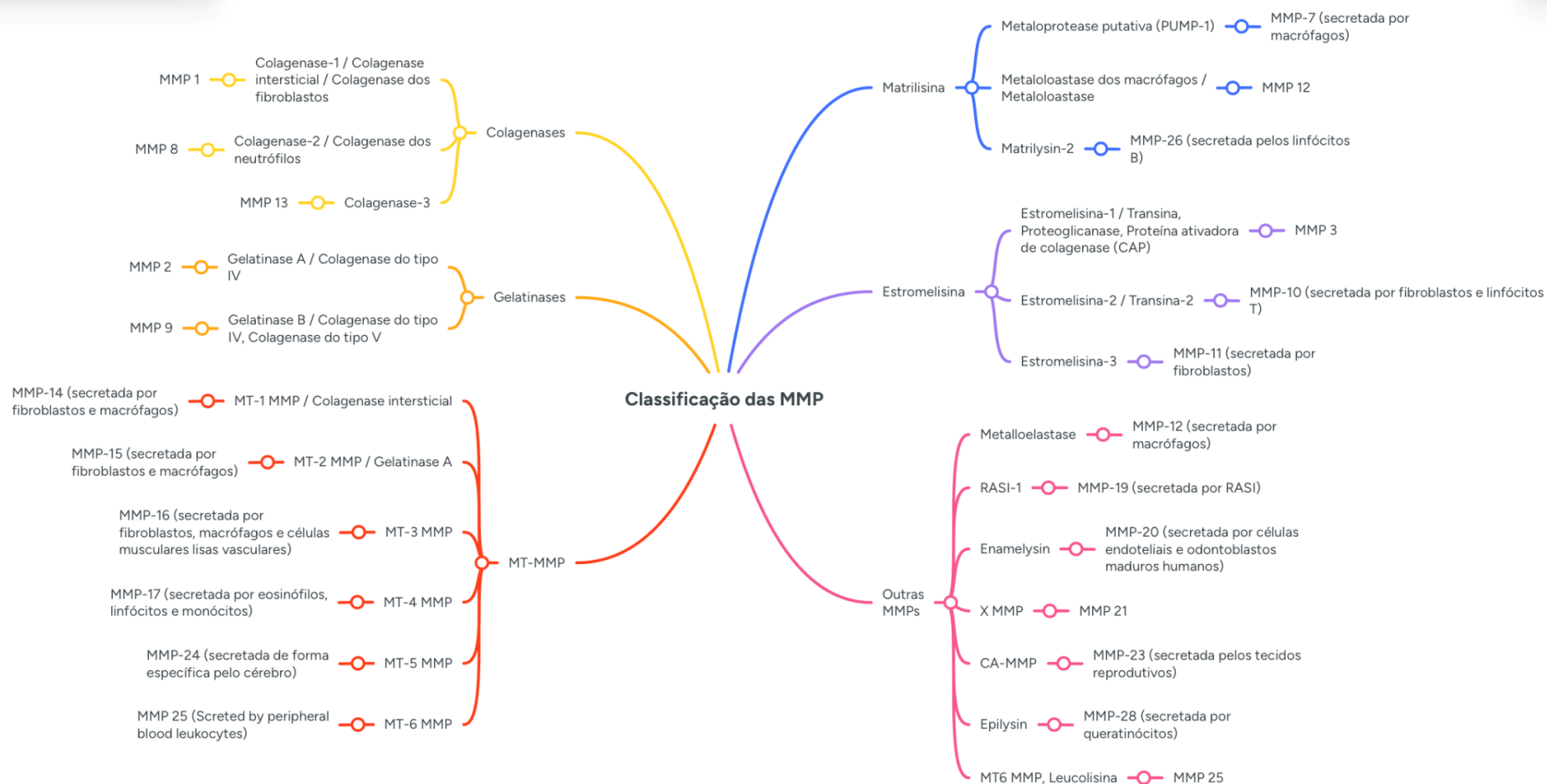


Figura 3 Classificação das MMP adaptada da tabela de (20). Ilustração própria.

As MMP partilham um motivo caraterístico de ligação ao zinco (HExxHxxGxxH), ou seja, uma sequência de aminoácidos em que duas histidinas (H) e um glutamato (E) estão espaçados por aminoácidos variáveis (representados por "x"). Um aminoácido glicina (G) também pode ser encontrado neste motivo de ligação. Este motivo é crucial para a capacidade da MMP de se ligar ao substrato e utilizar o zinco do seu domínio catalítico (17).



Figura 4 Organização geral do domínio das MMP. Ilustração própria.

No entanto, existem exceções a esta estrutura geral. Por exemplo, as MMP de tipo membranar têm um domínio transmembranar adicional que as fixa à membrana celular. Algumas MMP, como a MMP-7 e a MMP-26 (também conhecidas como matrilisinas), não têm uma região de ligação ou um domínio HPX, o que as classifica como "MMP mínimas". As MMP-2 e MMP-9 têm três repetições de motivos de fibronectina de tipo II no seu domínio catalítico. A MMP-17 e a MMP-25 são enzimas transmembranares de tipo I ancoradas à membrana por um resíduo de glicosilfosfatidilinositol no seu terminal C. A MMP-23, que contém um domínio transmembranar de tipo II que a ancora à membrana plasmática. Em vez do domínio HPX habitual, a MMP-23 tem um pequeno domínio semelhante a uma toxina e um domínio de molécula de adesão celular semelhante a uma imunoglobulina. As MMP-14, -15, -16 e -24 também têm um C-terminal adicional em comparação com outras MMP (17,20).

2.2 Ativação e regulação

As MMP são produzidas como pró-enzimas inativas, conhecidas como zimogénios ou pró-MMP, que requerem ativação para se tornarem funcionais. Esta ativação envolve a clivagem do domínio do pró-peptídeo, frequentemente catalisada por outras MMP, ou peptidases como as peptidases de serina, a plasmina, as peptidases bacterianas ou as peptidases da família das furinas. As do tipo membranar também podem estar envolvidas nesta ativação (20,22,23). A manutenção das pró-MMP num estado inativo baseia-se num mecanismo conhecido como "cysteine switch": a cisteína do motivo PRCGXP, na região pró-peptídica, está ligada ao zinco impedindo a atividade enzimática ilustrado na figura 5. Na ativação, esta ligação é quebrada disponibilizando o local catalítico, como ilustrado na figura 6. Para além

das enzimas, o pH ácido, a temperatura elevada, o stresse oxidativo e certos componentes da matriz extracelular podem também contribuir para a ativação das MMP (23,24).

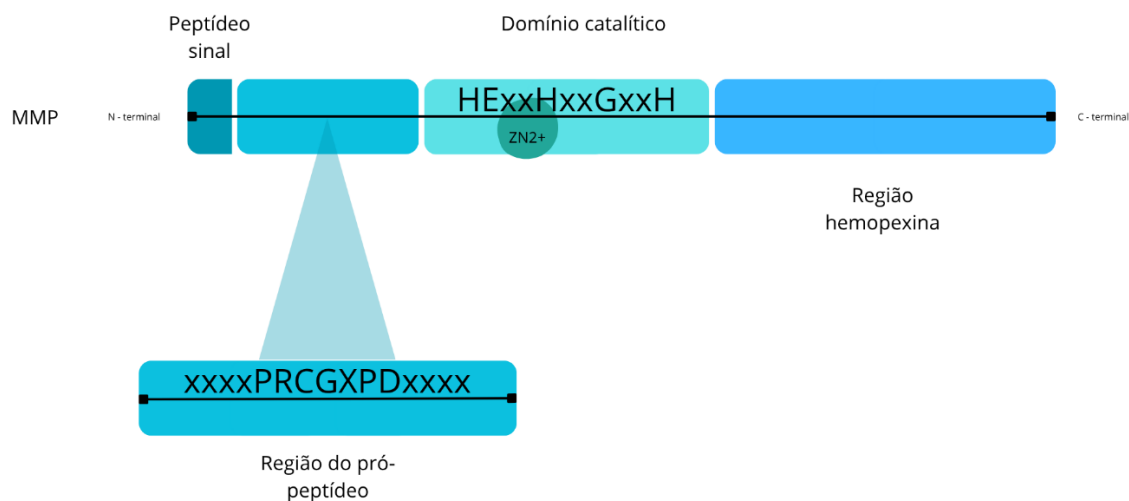
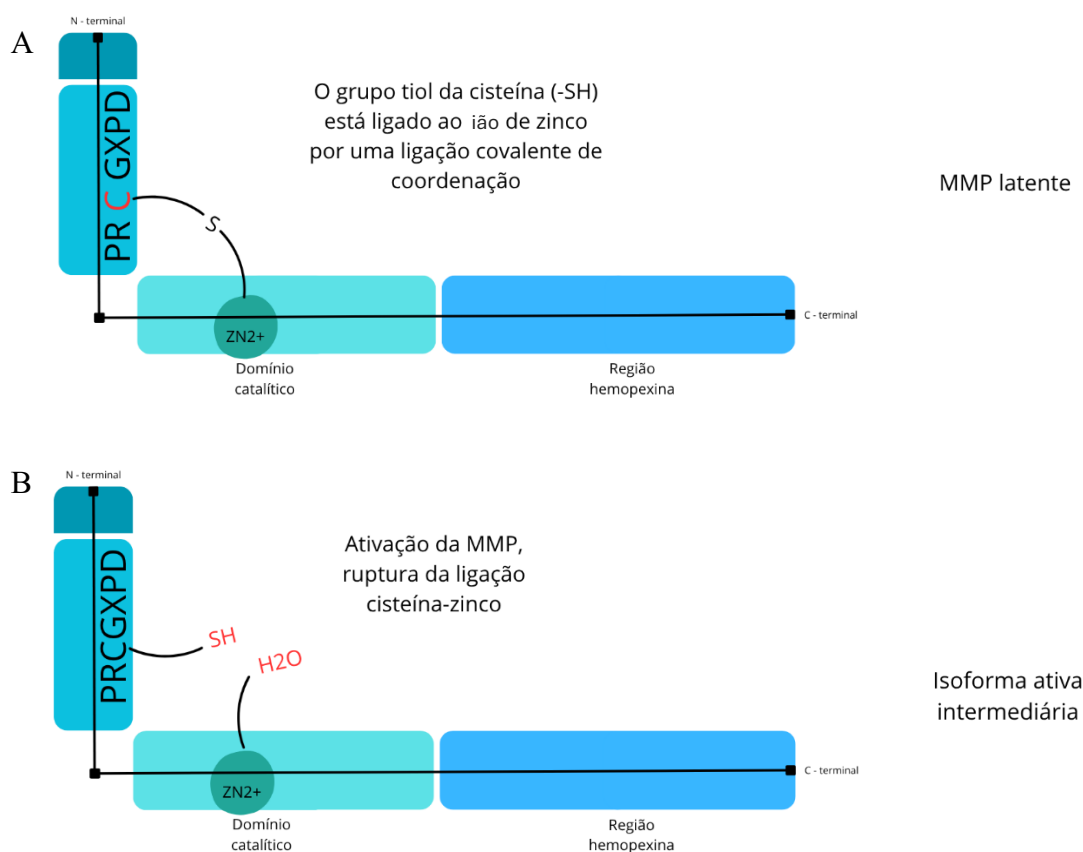


Figura 5 Organização geral do domínio das MMP, amplificação da região do pró-peptídeo. Ilustração própria.



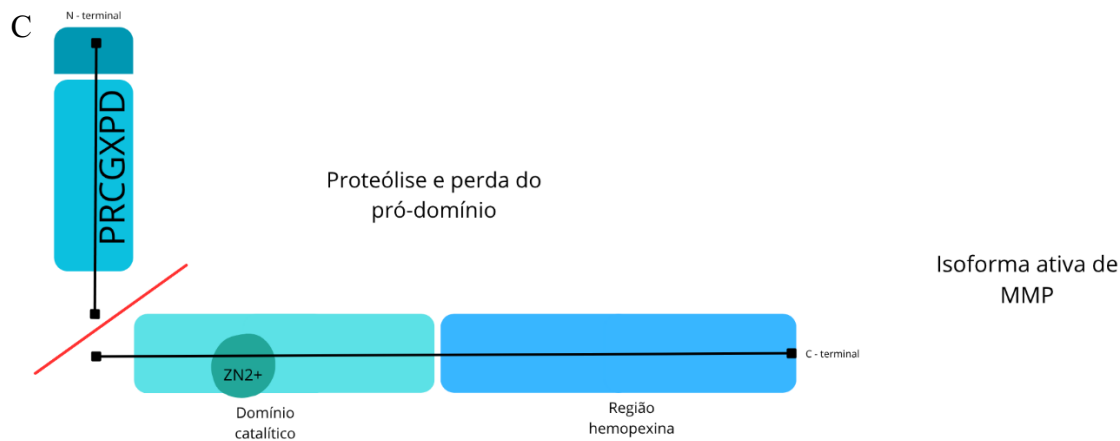


Figura 6 Estados de ativação, adaptado de (25). Ilustração própria.

A atividade das MMP é estritamente regulada para evitar a degradação excessiva dos tecidos. Os inibidores tecidulares específicos das metalopeptidases (TIMP) desempenham um papel fundamental nesta regulação, ao inibir especificamente a ação enzimática das MMP ativas e equilibrarem a sua atividade. Estas interações complexas entre a ativação e a inibição permitem controlar com precisão as funções biológicas das MMP, evitando assim desequilíbrios que podem conduzir a danos na integridade dos tecidos (20,22,23).

Entre as várias metalopetidases da matriz implicadas na resposta inflamatória e na destruição dos tecidos periodontais, a MMP-8 e MMP-9 têm sido mais focadas como potenciais marcadores biológicos da atividade da periodontite. Ambas participam ativamente na degradação dos principais componentes da matriz extracelular, nomeadamente o colagénio tipo I. A seguir, será abordada em maior detalhe a contribuição destas duas metalopeptidases para a fisiopatologia da doença periodontal (16,21).

2.3 MMP-8 e MMP-9

2.3.1 MMP-8

A metalopeptidase 8, descrita em 1968, foi isolada a partir de leucócitos polimorfonucleares (PMNL), o que lhe valeu os nomes PMNL-colagenase ou colagenase de neutrófilos, antes de ser também referida como MMP-8. Expressa principalmente pelos neutrófilos, a MMP-8 é armazenada como um zimogénio (pró-MMP) nos seus grânulos específicos, permitindo uma libertação rápida durante a resposta inflamatória para iniciar imediatamente a degradação da matriz extracelular. A MMP-8 pode ser produzida por outros tipos de células em resposta a sinais inflamatórios, incluindo condrócitos, fibroblastos mononucleares e células endoteliais. Alguns trabalhos indicam também que, em condições de

stress tecidular ou de sinalização pró-inflamatória, os fibroblastos e os macrófagos expressam MMP-8, embora estes níveis sejam geralmente inferiores aos observados nos neutrófilos. Também é importante notar que a MMP-8 representa a collagenase mais abundante presente na dentina (26–29).

Como já foi referido, a estrutura da MMP-8 é constituída por uma região pró-peptídica inibidora, um domínio catalítico que contém o zinco essencial para a sua atividade e um domínio de ligação ao substrato. Esta arquitetura requer a eliminação do pró-peptídeo por clivagem proteolítica para se tornar cataliticamente ativa. Estudos recentes confirmaram que esta ativação ocorre frequentemente no microambiente inflamatório, onde outras peptidases contribuem para a conversão da MMP-8 na sua forma ativa (28–30).

A MMP-8 é particularmente especializada na degradação do colagénio fibrilar tipo I. A especificidade desta enzima para este substrato deve-se ao reconhecimento da estrutura em tripla hélice do colagénio. Estudos demonstraram que a clivagem da tripla hélice leva à desestruturação progressiva da matriz extracelular, facilitando assim a remodelação dos tecidos e a cicatrização de feridas (29,31). Ao degradar os colagénios fibrilares, a MMP-8 facilita a migração das células imunitárias para os locais de infeção ou lesão, modulando assim a resposta inflamatória. De facto, estudos demonstraram que a atividade da MMP-8 permite a libertação de fragmentos da matriz que funcionam como moléculas de sinalização, modulando positiva ou negativamente vários processos inflamatórios e de reparação (29,31,32). Estes fragmentos podem atuar como quimiocinas ou modulando a atividade de outros mediadores, reforçando assim a coordenação entre a inflamação e a remodelação dos tecidos.

Tal como acontece com outras MMP, a atividade da MMP-8 é estritamente controlada a nível transcricional, por ativação zimogénica, por inibição devida a TIMP e a α 2-macroglobulina, presente no plasma e no fluído gengival, de modo a evitar a degradação excessiva da matriz extracelular (15,20). No caso da MMP-8, os principais TIMP responsáveis pela sua inibição são o TIMP-1 e, em menor grau, o TIMP-2, sendo o TIMP-1 aquele que apresenta maior afinidade e eficácia na sua neutralização. A pró-MMP-8 requer ativação proteolítica para se tornar funcional. Esta ativação pode ocorrer por meio de outras peptidases, como a plasmina, a tripsina, a elastase neutrofílica e mesmo outras MMP (23,29)

2.3.2 MMP-9

A MMP-9, também denominada gelatinase B ou colagenase B do tipo IV, é expressa por uma vasta gama de células, incluindo não só neutrófilos e macrófagos durante respostas inflamatórias agudas, mas também células endoteliais e certas células tumorais, particularmente no contexto de stresse, hipoxia ou transformação celular (22,33).

A expressão da MMP-9 pode ser modulada por vários estímulos pró-inflamatórios e fatores de crescimento como a IL-1 β , o TNF- α e o VEGF, o que lhe permite ser rapidamente ativada quando necessário em qualquer ambiente (33). A sua ativação envolve a clivagem proteolítica da forma latente por enzimas como a MMP-3, a elastase neutrofílica e a plasmina, que expõem o domínio catalítico ativo. No que diz respeito à sua regulação negativa, a MMP-9 é inibida principalmente pelo TIMP-1, que forma complexos de elevada afinidade com a pró-MMP-9, prevenindo a sua ativação precoce ou excessiva. A α 2-macroglobulina fluído também atua como inibidor inespecífico, capturando MMP ativas para impedir a degradação difusa da matriz extracelular (23,33). A MMP-9 desempenha um papel decisivo em vários processos patológicos. Ao degradar componentes essenciais da matriz extracelular, como o colagénio de tipo IV, um dos principais constituintes da membrana basal. A MMP-9 não só facilita a migração celular, como também a angiogénese, que é um mecanismo muito importante no estudo dos tumores e da cancerização (28,33,34).

Ao facilitar a reorganização da matriz extracelular, a MMP-9 desempenha um papel fundamental em processos como a cicatrização de feridas e a regeneração de tecidos, tal como a MMP-8, já referida. Mas esta atividade proteolítica também pode ser desviada em contextos patológicos, nomeadamente na progressão tumoral e a disseminação metastática (34).

2.4 Papel da MMP-8 e MMP-9 na degradação dos tecidos periodontais

O processo inflamatório começa com a ativação do sistema imunitário inato: as bactérias patogénicas libertam toxinas (lipopolissacáridos, enzimas proteolíticas) que estimulam as células imunitárias residentes como os queratinócitos, macrófagos e células dendríticas presentes no periodonto. Em resposta, estas células segregam citocinas pró-inflamatórias, recrutando mais neutrófilos e macrófagos para o local da infeção (35). Os neutrófilos que são as primeiras células a serem recrutadas para os tecidos periodontais inflamados, desempenham um papel crucial na fagocitose dos agentes patogénicos periodontais. Para além desta função, libertam várias substâncias antimicrobianas, incluindo MMP (20).

A Figura 7 apresenta um esquema que ilustra o mecanismo da resposta imunitária ao nível do periodonto, evidenciando o início da degradação tecidual.

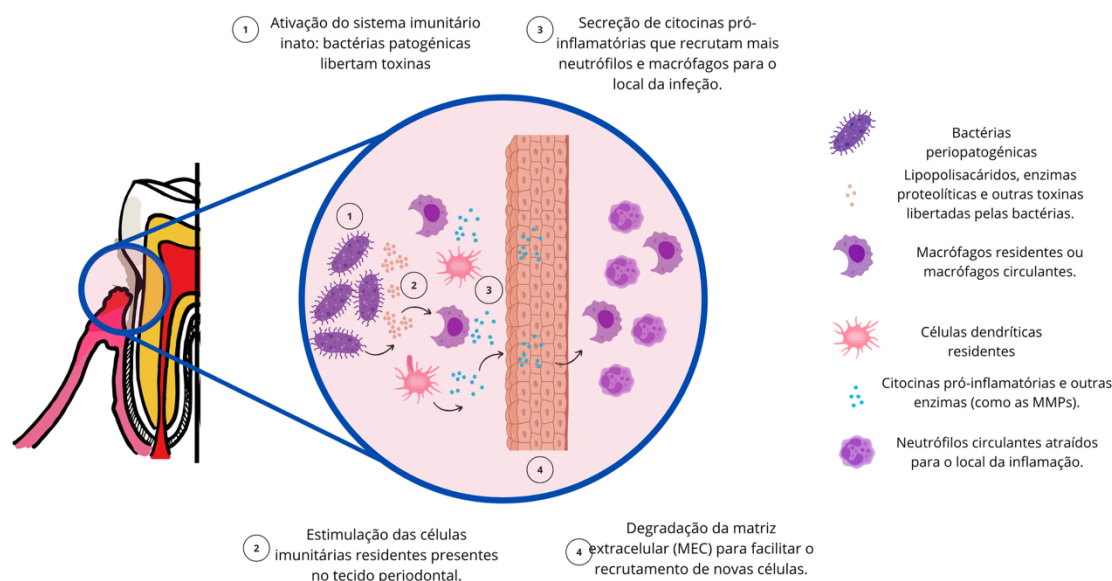


Figura 7 Representação esquemática da resposta inflamatória no periodonto. Ilustração própria.

No periodonto, a degradação da MEC baseia-se numa cascata enzimática orquestrada principalmente pelas MMP-8 e MMP-9. A forma ativa da MMP-8 inicia o processo através da clivagem do colagénio tipo I, um dos principais constituintes da MEC. Esta atividade facilita a migração das células imunitárias para os locais de infecção (36). A MMP-9 tem como alvo a gelatina e o colagénio de tipo IV, desempenhando um papel na degradação da membrana basal e na migração de leucócitos para os tecidos infetados (28). Este mecanismo é amplificado na presença de estímulos pró-inflamatórios, nomeadamente citocinas como a IL-1 β e o TNF- α , bem como o stresse oxidativo e os produtos bacterianos, que induzem a sobre-expressão das MMP (28,35).

O stresse oxidativo e as MMP-8 e MMP-9 estão intimamente ligados no contexto da inflamação e da degradação dos tecidos periodontais. Corresponde a um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e os mecanismos de defesa antioxidante do organismo. Foi demonstrado que estas ROS podem estimular a libertação de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α , IL-1 β), que induzem a expressão de MMP-8 e MMP-9 por neutrófilos, macrófagos e fibroblastos (37). As ROS podem também ativar diretamente as MMP, quebrando o "interruptor de cisteína" tornando-as imediatamente ativas (38). Por fim, as ROS podem também inibir os TIMP, que normalmente regulam a atividade das MMP (24). Desta forma, o equilíbrio entre a degradação e a reparação é perturbado, acelerando a

destruição dos tecidos periodontais Na ausência de um controle adequado por TIMP, esta atividade pode tornar-se excessiva e levará destruição progressiva dos tecidos periodontais, resultando na perda de inserção e reabsorção óssea características da periodontite (20,23).

2.5 Polimorfismos de nucleótido único nas regiões promotoras dos genes MMP-8 e MMP-9

Os polimorfismos de nucleótido único (SNP) são pequenas variações na sequência do DNA que ocorrem quando uma única base é substituída por outra numa posição específica do genoma. Quando localizados em regiões reguladoras dos genes, como os promotores, podem influenciar a transcrição genética e, conseqüentemente, a produção de proteínas. Têm sido amplamente estudados pela sua relevância na variabilidade interindividual, predisposição genética a doenças complexas, como a periodontite, e no contexto da medicina personalizada (39,40). Considerando as diferenças de suscetibilidade entre indivíduos à doença periodontal, tem-se explorado a hipótese de que o perfil genético individual pode modular a resposta inflamatória do hospedeiro (39–41). Diversos SNP foram identificados em genes com papel na imunidade e na degradação tecidular, como é o caso das MMP. No gene MMP-8, destacam-se os SNP –799C>T e +17C>G. O polimorfismo –799C>T, situado na região promotora, tem demonstrado, em ensaios *in vitro*, reduzir a afinidade de ligação de fatores repressores à sequência promotora, levando a um aumento da transcrição e da expressão da MMP-8 (42–45). Por outro lado, o SNP+17C>G, embora localizado após o início da transcrição, pode igualmente influenciar a estabilidade do mRNA ou a eficiência da tradução (42–44). No gene MMP-9, o SNP –1562C>T tem sido igualmente estudado, tendo-se verificado que o alelo T está associado a maior atividade do promotor, o que pode levar a uma produção aumentada da enzima (46). Embora vários estudos apontem para uma possível associação entre estes SNP e a periodontite, os dados ainda são contraditórios, e continua a ser necessário esclarecer se estas variações genéticas influenciam de forma significativa a suscetibilidade à doença ou a sua progressão.

3. MMP-8 e MMP-9 como biomarcadores

Devido ao seu envolvimento na degradação do tecido periodontal, a MMP-8 e MMP-9 foram identificadas há vários anos como potenciais biomarcadores para avaliar a atividade inflamatória e a progressão/gravidade da doença periodontal. A sua presença e níveis de expressão nos tecidos periodontais ou fluídos biológicos (como o fluido gengival ou a saliva) parecem estar frequentemente correlacionados com a gravidade da inflamação periodontal e a destruição dos tecidos de suporte (16,21).

O estudo do fluido gengival crevicular (FGC) é particularmente relevante na investigação da periodontite, pois este fluido inflamatório reflete com precisão as alterações bioquímicas e imunológicas que ocorrem nos tecidos periodontais. Rico em enzimas, citocinas, metalopetidases e outros mediadores da inflamação (45), é de recolha simples, rápida e bem tolerada, tornando o FGC uma fonte acessível e promissora para a monitorização da atividade da doença, da resposta ao tratamento e para a identificação de biomarcadores associados à destruição tecidular.

Vários estudos têm investigado a correlação entre os níveis das metalopetidases MMP-8 e MMP-9 e a gravidade da periodontite, demonstrando, em muitos casos, que níveis elevados destas enzimas no fluido gengival crevicular estão associados a formas mais avançadas da doença (47,48). Estes dados sugerem o seu potencial como biomarcadores de atividade inflamatória e destruição tecidular. No entanto, embora exista uma base de evidência, alguns autores permanecem céticos quanto à universalidade desta correlação (48). Persistem dúvidas sobre a especificidade das MMP como marcadores fiáveis, bem como sobre a sua capacidade de prever com exatidão a evolução clínica da periodontite. Esta falta de consenso sublinha a importância de realizar estudos laboratoriais mais aprofundados, que permitam confirmar ou refutar as hipóteses atuais, aperfeiçoar a compreensão do papel das MMP-8 e MMP-9 na fisiopatologia da doença periodontal e avaliar com rigor o seu valor clínico como ferramentas de diagnóstico e prognóstico (20).

4. Objetivos e hipóteses

Os objetivos deste estudo foram I) investigar a possível associação entre os polimorfismos nos genes MMP-8 (-799C>T e +17C>G) e MMP-9 e a ocorrência de periodontite, considerando a influência genética na suscetibilidade à doença; e II), avaliar os níveis das enzimas MMP-8 no fluido gengival crevicular e explorar a sua eventual correlação com a ocorrência e gravidade clínica da periodontite, com o intuito de validar o seu potencial como biomarcadores precoces no diagnóstico e monitorização da doença periodontal.

Hipóteses estatísticas:

- H1₀ (Hipótese nula): Os polimorfismos nos genes das MMP-8 e MMP-9 não têm associação significativa na suscetibilidade à periodontite.
- H1₁ (Hipótese alternativa): Os polimorfismos nos genes das MMP-8 e MMP-9 estão associados a uma maior suscetibilidade à periodontite.
- H2₀ (Hipótese nula): Os polimorfismos nos genes das MMP-8 não têm associação significativa com os níveis de MMP-8 no FGC.
- H2₁ (Hipótese alternativa): Os polimorfismos nos genes das MMP-8 estão associados aos níveis de MMP-8 no FGC
- H3₀ (Hipótese nula): Não há diferença significativa na concentração de MMP-8 no FGC entre pacientes com periodontite e indivíduos periodontalmente saudáveis.
- H3₁ (Hipótese alternativa): A concentração de MMP-8 no fluido crevicular gengival é significativamente diferente em pacientes com periodontite do que em indivíduos periodontalmente saudáveis, indicando o seu potencial papel como biomarcadores de doença.

II. Materiais e métodos

5. Considerações gerais

Este estudo observacional, intitulado "As metaloproteinases MMP-8 e MMP-9 no fluído crevicular de indivíduos com doença periodontal" insere-se no projeto científico MMP-89POLYACT, financiado pelo programa CiiEM Investiga, sob o título "Relação entre polimorfismos do gene promotor das metaloproteinases 8 e 9, atividade proteica e suscetibilidade à periodontite numa população portuguesa", coordenado pela investigadora principal Madalena Oom.

O estudo foi aprovado pela Comissão Científica do MIMD e pela Comissão de Ética da Egas Moniz (Processo Interno nº 922 - ver Anexo 1). A Direção da Clínica Dentária Egas Moniz (CDEM) também autorizou o acesso aos dados clínicos dos pacientes e a recolha de amostras para fins de investigação (Anexo 2).

Este trabalho é uma continuação do trabalho de Catarina Alexandra dos Santos Rato (49), Mariana Nascimento Ferreira(50) e Inês Martins Almeida (51), que obtiveram o grau de mestre em Medicina Dentária na Egas Moniz 2022 e 2023, respetivamente. Por esse motivo baseia-se em parte, em dados previamente recolhidos e ou analisados.

O trabalho foi realizado na clínica universitária no âmbito das consultas de periodontologia e triagem na Clínica Dentária Egas Moniz, e nos Molecular Biology Lab e no Microbial Communities and Antimicrobial Resistance Lab da Egas Moniz School of Health and Science.

6. Estudo clínico

6.1 Seleção da Amostra

Os participantes foram selecionados nas consultas de triagem e periodontologia da Clínica Dentária Egas Moniz tendo sido alocados a dois grupos: um grupo com saúde periodontal (controlo), e um grupo constituído por pacientes diagnosticados com periodontite (grupo de teste). Os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão previamente definidos e registados num questionário (Anexo 3). Foram excluídos pacientes com outra patologia inflamatória crónica que não seja periodontite, em período de gestação ou em período de amamentação, em tratamento

ortodôntico, com perda ponderal patológica significativa e doentes submetidos a tratamento periodontal nos últimos seis meses.

Antes da recolha das amostras de fluido crevicular gengival (FGC), todos os candidatos foram submetidos a uma avaliação periodontal por um médico dentista e foi efetuado um exame periodontal de boca completa (Anexo 4). Com base nos dados obtidos, foi estabelecido o diagnóstico para cada participante, de acordo com a nova classificação das doenças periodontais e peri-implantares adotada pela Academia Americana de Periodontologia (AAP) e pela Federação Europeia de Periodontologia (EFP) em 2017. Após terem sido selecionados para participar neste estudo, os participantes foram informados dos objetivos do mesmo, tendo assinado um termo de consentimento informado (Anexo 5).

6.2 Recolha de fluido crevicular gengival

As amostras de FGC utilizadas neste estudo foram recolhidas, quantificadas e armazenadas no âmbito de trabalhos anteriores (49–51), utilizando o protocolo descrito por Hernández e al., 2010 (52).

O FGC foi recolhido antes de qualquer outra ação por parte do paciente ou do profissional (sem elixir bucal ou exame clínico), a fim de evitar qualquer sangramento ou de estimular a sua produção. Uma vez registados os dados do participante e assinado o consentimento informado, a área de amostragem foi relativamente isolada utilizando rolos de algodão, pontas secas e um aspirador de saliva para evitar a contaminação da amostra por placa bacteriana, saliva ou sangue. Todas as amostras foram colhidas com tiras de papel absorvente (Oralflow, EUA) na superfície mesiovestibular dos dentes 11 e 36 para os pacientes do grupo de controlo. Na ausência de um destes dentes, as amostras foram colhidas no dente adjacente ou contralateral; nos doentes com periodontite, as amostras foram colhidas nas bolsas periodontais com maior profundidade de sondagem. A tira de papel foi inserida durante 30 segundos no sulco ou bolsa periodontal, e as amostras que apresentavam sinais de contaminação por saliva ou sangue foram descartadas. Todos os investigadores envolvidos seguiram protocolos normalizados para a recolha das amostras de fluido crevicular para assegurar a coerência do processo de recolha e garantir uma amostra representativa e comparável.

6.3 Quantificação do fluido crevicular gengival

A quantificação do FGC foi efetuada imediatamente após a recolha utilizando o Periotron (Oralflow, Inc). A conversão de unidades arbitrárias para volume de fluido (μL) foi efetuado por referência a uma curva de calibração previamente realizada. As amostras foram armazenadas em tubos Eppendorf codificados a uma temperatura de -80°C .

6.4 Preparação de amostras para análise

As amostras foram retiradas do armazenamento a -80°C e colocadas em gelo para descongelação. Cada amostra foi diluída em $50\ \mu\text{L}$ de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril durante 5 minutos antes da centrifugação. Para otimizar a extração do fluido, a zona não absorvente do periopaper (cor de laranja) foi fixada à tampa do tubo Eppendorf antes da centrifugação. As amostras foram então centrifugadas a 5000 rpm, 4°C durante 5 minutos (VWR® Mega Star 600/600R). O conteúdo de cada amostra foi dividido em três tubos separados e armazenado novamente a -80°C para conservação.

6.5 Análise da atividade das MMP por zimografia

Para a realização das experiências de zimografia, foram preparados géis de poli(acrilamida) em duas fases distintas: um gel de concentração (4% de acrilamida) e um gel de resolução (10% de acrilamida, Bio-Rad®). O gel de resolução foi enriquecido com colagénio tipo I (3,9 mg/mL, obtido de cauda de rato, Sigma-Aldrich®), substrato das colagenases envolvidas na periodontite, permitindo a deteção da atividade enzimática das MMP. A polimerização foi iniciada com a adição de persulfato de amónio e TEMED, sendo os géis imediatamente vertidos entre duas placas de vidro (com separadores de 1 mm e inseridas numa cassette).

Foram preparados dois conjuntos distintos de amostras, um com uma seleção de amostras de pacientes saudáveis e outro de pacientes com doença periodontal. A concentração de proteínas em cada conjunto foi determinado por um método colorimétrico, seguindo as recomendações do fabricante (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoScientific, versão de janeiro de 2020). Este método baseia-se na redução de Cu^{2+} a Cu^{+} em meio alcalino, seguida da formação de um complexo colorido entre Cu^{+} e ácido bicinconínico, cuja absorvância foi medida a 562 nm. A concentração final

foi obtida por interpolação numa curva padrão de BSA (0 a 2000 µg/mL), e um volume de 25 µL de cada conjunto foi aplicado nos poços dos géis, após diluição com tampão de amostra não redutor.

Foi adicionado um marcador de peso molecular (NZYColour Protein Marker I, NZYTech®), bem como uma solução de MMP-8 recombinante humana (Sigma-Aldrich®), utilizada como controlo positivo, ativada com p-aminofenilmercúrio a 37 °C durante 1 hora. Outras condições experimentais incluíram a adição de MMP-8 inativa e. A disposição dos géis e a organização das amostras variaram consoante a experiência, mas todas foram realizadas sob as mesmas condições de preparação e análise.

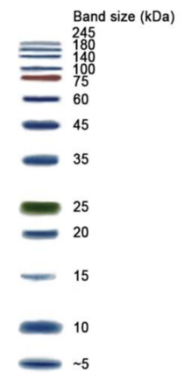


Figura 8 NZYColour Protein Marker I, NZYTech®

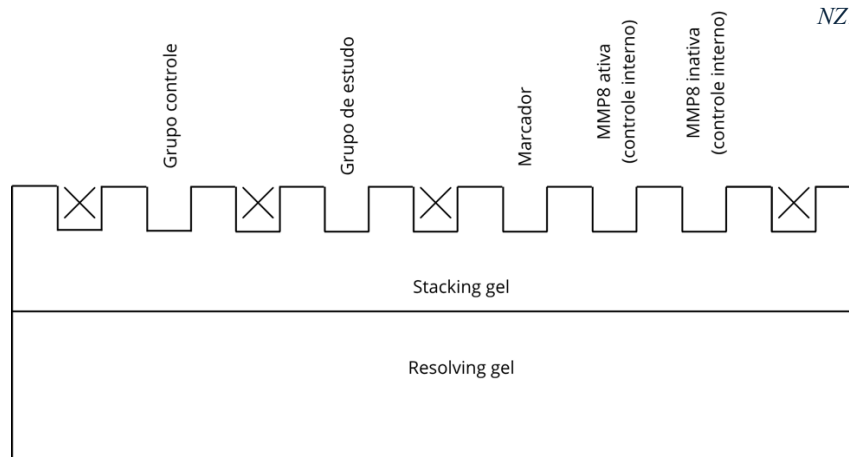


Figura 9 Representação de um dos géis utilizado. Ilustração própria.

A eletroforese foi efetuada durante 15 minutos a 90 V, seguida de aproximadamente 2 horas a 200 V em tampão Tris/Glicina/SDS (Bio-Rad®). Os géis foram então lavados duas vezes durante 30 min com uma solução de Triton X-100 a 2,5% para remover o SDS e renaturar as enzimas. A incubação decorreu em condições ótimas para a digestão do colagénio, numa solução de 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM ZnCl₂ e 0,02% Brij 35, a 37°C, durante um período variável, dependendo dos ensaios que realizámos. Após a incubação, os géis foram corados com Coomassie Blue R-250 (Bio-Rad®) durante 1 h, e descolorados até aparecerem bandas visíveis de atividade proteolítica como áreas incolores contrastando com o fundo azul dos géis.

Os géis foram analisados por densitometria utilizando o software Fiji após a fotografia. O peso molecular das bandas foi estimado por comparação com o marcador de peso molecular e a curva de calibração correspondente (Figura 10).

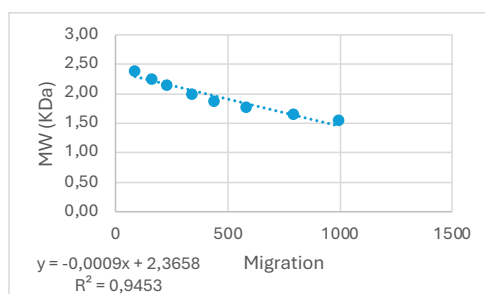


Figura 10 Curva de calibração usada na análise das massas moleculares

6.6 Quantificação de MMP-8 por ELISA

A quantificação da concentração de MMP-8 nas amostras de FGC foi realizada por meio de um ensaio imunoenzimático tipo ELISA (Human MMP-8 ELISA Kit, Sigma-Aldrich®), de acordo com as recomendações do fabricante.

As amostras, armazenadas a -80 °C, foram descongeladas em gelo e diluídas em PBS estéril, de modo a atingirem concentrações compatíveis com a faixa de deteção do ensaio (0-6000pg/ml). Após homogeneização à temperatura ambiente (18–25 °C), 100 µL de cada amostra ou padrão foram dispensados, em duplicado, numa placa de 96 poços previamente revestida com anticorpos anti-MMP-8.

A leitura da absorvância foi efetuada a 450 nm num leitor de microplacas. Uma curva padrão foi construída a partir de diluições conhecidas de MMP-8, e as concentrações das amostras foram determinadas por interpolação, com aplicação de uma equação polinomial de 4.º grau, conforme especificado pelo fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL, tendo em consideração a diluição do FGC..

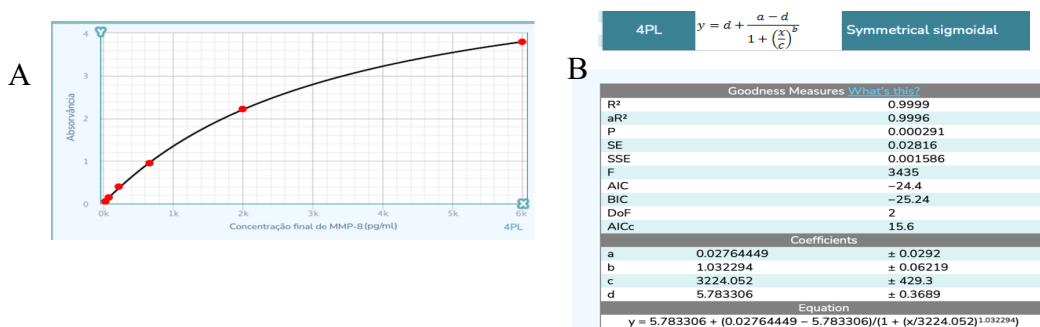


Figura 11 A e B Representações gráficas das equações obtidas para a regressão não linear 4PL da MMP-8. Curvas geradas com o software MyCurveFit®.

6.7 Recolha de material genético

O material genético foi recolhido utilizando um uma zaragatoa estéril de utilização única com uma ponta amovível que pode ser ejetada através de um mecanismo integrado (OmniSwab, Whatman FTA). A amostragem foi efetuada esfregando firmemente a extremidade absorvente do OmniSwab contra a mucosa jugal do paciente.



Figura 12 OmniSwab, estéril (100), Whatman fia Qiagen®

Após a recolha, as amostras foram colocadas em tubos Eppendorf codificados mantidas em gelo até serem armazenadas a -20°C.

6.8 Extração de ADN

O ADN foi extraído utilizando o protocolo "Isolation of Total DNA from Surface and Buccal Swabs" do QIAamp DNA Investigator Handbook.

Em primeiro lugar, procedeu-se à lise das células, adicionando 20 µl de proteínase K e 600 µl de tampão ATL a cada amostra, utilizando micropipetas calibradas. Os tubos foram então agitados em vórtex durante 10 segundos para homogeneizar as amostras. Estas foram então incubadas num bloco de aquecimento a 56°C durante 1 hora, com agitação em vórtex durante 10 segundos de 10 em 10 minutos. Foi efetuada uma breve centrifugação para remover quaisquer gotículas aderentes às paredes internas dos tubos. Em seguida, foram adicionados 600 µl de tampão AL às amostras, seguido de agitação em vórtice durante 15 segundos. É essencial que a amostra e o tampão AL sejam bem misturados para garantir uma lise eficiente. A incubação foi então repetida a 70°C durante 10 minutos, com agitação em vórtex durante 15 segundos de 3 em 3 minutos para garantir uma lise completa. Como o tampão ATL e o tampão AL são tampões de lise, a sua adição provocou a rutura das membranas celulares, libertando as moléculas de ADN de cada amostra contida nos tubos Eppendorf. No final, adicionou-se 300 µl de etanol (96%), para se proceder à precipitação do DNA dissolvido na solução de lise.

A etapa seguinte da extração de ADN consistiu em transferir 700 µl de cada amostra para uma coluna QIAamp MinElute inserida num tubo de recolha de 2 ml. Esta etapa exigiu uma grande precisão para evitar o contacto com a membrana de sílica. A

centrifugação foi efectuada a 8000 rpm (6000 x g) durante 1 minuto, após o que o líquido não retido na coluna foi cuidadosamente removido. A coluna é então recolocada num novo tubo de recolha de 2 ml e a operação é repetida para amostras superiores a 700 µl. Este passo separa todos os componentes da lise celular do DNA precipitado. Em seguida, foram adicionados 500 µl de tampão AW1 sem tocar na membrana, seguido de centrifugação durante 1 minuto a 8000 rpm. Depois de retirar o tubo de recolha que continha o líquido residual, a coluna QIAamp MinElute foi recolocada num novo tubo de recolha de 2 ml. Esta operação foi repetida utilizando 700 µl de tampão AW2 em vez de tampão AW1. Estes dois tampões de lavagem removeram os componentes não retidos pela coluna, deixando apenas as moléculas de ADN ligadas à membrana de sílica. De seguida, adicionou-se 700 µl de etanol (96%), seguido de centrifugação durante 1 minuto a 8000 rpm. O etanol removeu a água associada ao ADN retido na coluna e permitiu reforçar a sua insolubilidade. Depois de retirar o tubo de recolha que continha o líquido residual, a coluna QIAamp MinElute foi colocada num novo tubo de recolha de 2 ml e centrifugada a 14 000 rpm (20 000xg) durante 3 minutos para secar completamente.

A coluna foi então transferida para um tubo de Eppendorf e o tubo de recolha foi retirado. A coluna foi cuidadosamente aberta e incubada durante 3 minutos a 56°C (para reforçar a secagem).

Por fim, foram adicionados 50 µl de Buffer ATE à temperatura ambiente ao centro da membrana de cada amostra para assegurar a eluição completa do ADN. Esta etapa foi efectuada em duas fases: 25 µl de Buffer ATE foram adicionados a cada coluna, seguidos de incubação à temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 minuto. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm durante 1 minuto. Esta divisão em duas fases aumentou significativamente a concentração final de ADN no eluato.

Uma vez concluída a extração, os tubos Eppendorf que continham as amostras de ADN foram conservados no frio a -20°C.

6.9 Técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)

O promotor dos genes MMP-8 e MMP-9, presente no ADN de cada amostra, foi amplificado por PCR. Esta técnica requer a utilização de iniciadores específicos para cada polimorfismo estudado. As sequências dos iniciadores *forward* e *reverse* utilizados foram descritas em vários estudos:

- Para o polimorfismo **MMP-8 -799 C>T (rs11225395)**, os iniciadores foram relatados por Shen et al. (2017) em *The Contribution of MMP-8 Promoter Polymorphisms in Lung Cancer*.
- Para o polimorfismo **MMP-8 +17 C/G (rs2155052)**, foram utilizados iniciadores de acordo com um protocolo descrito por Shen et al. (2017) em *The Contribution of MMP-8 Promoter Polymorphisms in Lung Cancer*
- Para o polimorfismo **MMP-9 -1562 C>T (rs3918242)**, os iniciadores foram descritos por Liu et al. (2018) em *Correlations of MMP-2 and MMP-9 gene polymorphisms with susceptibility to hepatocellular carcinoma*.

O protocolo de PCR foi efetuado de acordo com as condições descritas nos respectivos estudos.

Tabela 3 Resumo dos iniciadores, condições de PCR e enzimas de restrição para os polimorfismos MMP-8 e MMP-9

Polimorfismo	iniciadores (5'-3')	Condições de PCR	Enzima de restrição	Fragmentos obtidos
MMP-8 -799 C>T (rs11225395)	F: CCATCTTCACATAGCCTTGG R: CCTTGTCTTCTGCCTGTGAA	94°C - 5 min 35 ciclos : - 94°C 30s, - 57°C 30s, - 72°C 30s 72°C - 10 min	SfcI	285 pb (TT) 172+113 pb (CC)
MMP-8 +17C/G (rs2155052)	F: CTGTTGAAGGCCTAGAGCTGCTCC R: CATCTTCTCTTCAAATCTTACCC	95°C - 1 min 35 ciclos : - 95°C 30s, - 55°C 30s, - 72°C 30s 72°C - 5 min	DdeI	799, 90 e 79 pb (CC) 878 e 90 pb (CG)
MMP-9 -1562 C>T (rs3918242)	F: GCCTGGCACATAGTAGGCCC R: CTTCTAGCCAGCCGGCATC	95°C - 5 min 35 ciclos : - 94°C 30s, - 64,5°C 30s, - 72°C 45s 72°C - 10 min	SphI	435 pb (CC) 247+188 pb (TT)

Antes de iniciar o protocolo PCR, quantificamos o ADN presente nas amostras utilizando um espectrofotômetro *Thermo Scientific NanoDrop One*. Foram aplicados cerca de 1-2 μ L de amostra na superfície da cuvete e a concentração de ADN foi determinada medindo a absorvância a 260 nm.

O visor digital apresenta uma série de informações para além dos valores de concentração de ADN, incluindo relatórios, A260/A280 e A260/A230. Estes rácios determinam o grau de pureza do ADN. Uma relação 260/280 entre 1,65 e 2 indica ADN de boa qualidade, com um valor ótimo de cerca de 1,8, considerado o limiar máximo de pureza. Um rácio inferior a 1,65 sugere a presença de contaminantes proteicos, enquanto um valor superior a 2 indica contaminação por ARN. Além disso, a razão 260/230 deve ser maior ou igual a 1,8 para garantir a ausência de resíduos de solventes orgânicos utilizados durante a extração do ADN. Qualquer desvio em relação a estes valores indica uma pureza insuficiente, o que pode comprometer a integridade das análises subsequentes.

Começamos então por diluir os iniciadores para uma concentração final de 10 μ M. De seguida, foram feitas as soluções de PCR, com os volumes finais de reagentes necessários para preparar o Master Mix (nome dado à solução global feita num único tubo que será redividido em vários tubos consoante o número de amostras a anotar).

Esta Master Mix continha água H₂O sem DNase/RNase, Kit MyTaq (incluindo Taq DNA Polymerase, dNTPs e tampão contendo MgCl₂), bem como primers forward e reverse.

Tabela 4 Preparação de cada tubo PCR

	Soluções	Valor de referência
Mistura principal	MyTaq	12,5 μ l
	Primário para a frente	1 μ l
	Primário inverso	1 μ l
	H ₂ O sem DNase/RNase	7,5 μ l
	ADN	3 μ l
	V _{final}	25 μ l

A mistura foi preparada para o número de amostras a analisar, um controlo negativo (sem ADN) e uma margem adicional para compensar eventuais erros de pipetagem.

Foram então numerados minitubos Eppendorf de 0,5 ml para cada amostra a analisar. Para cada tubo, foram transferidos 22 µl do Master Mix, seguidos de 3 µl de ADN para cada amostra, com exceção do controlo negativo, ao qual foram adicionados 3 µl de água sem DNase/RNase em vez de ADN. Assim, cada tubo continha um volume final de 25 µl.

Finalmente, as amostras foram colocadas num termociclador de Promega para amplificação. Para efetuar as amplificações, foram executados programas de acordo com as condições descritas na Tabela 3.

Uma vez terminada a PCR, tomámos 3µl de cada amostra e adicionámos 3µl de água sem DNase/RNase e 1µl de azul de bromofenol. Em seguida, procedeu-se a uma eletroforese rápida num gel de agarose a 1%, na horizontal, para verificar, antes da restrição, se as bandas específicas eram visíveis e se o controlo negativo estava isento de contaminação.

O protocolo pormenorizado para a produção de gel e a técnica de eletroforese será discutido mais adiante no ponto 10.2.4.

6.10 Análise dos polimorfismos MMP-8⁻⁷⁹⁹, MMP-8⁽⁺¹⁷⁾ e MMP-9⁻¹⁵⁹² por *Polimorfismo de tamanho de Fragmentos de Restrição* (RFLP)

A técnica RFLP foi utilizada para analisar os polimorfismos MMP-8⁻⁷⁹⁹, MMP-8⁽⁺¹⁷⁾ e MMP-9⁻¹⁵⁹². Para cada um dos polimorfismos, foi efectuada uma solução diferente com base nas restrições enzimáticas específicas para cada alvo.

- SfcI para MMP-8⁻⁷⁹⁹
- DdeI para MMP-8⁺¹⁷
- SphI MMP-9⁻¹⁵⁹²

A escolha das enzimas de restrição SfcI, DdeI e SphI deve-se à sua capacidade de reconhecer e hidolisar especificamente as sequências de DNA alteradas pelos polimorfismos em estudo e assim discriminam os locais de restrição relevantes para a análise genética dos polimorfismos do MMP-8⁻⁷⁹⁹, MMP-8⁺¹⁷ e MMP-9⁻¹⁵⁹².

¹⁵⁹² respectivamente. Cada uma destas enzimas permite distinguir entre os alelos variantes e selvagens nos respectivos loci, tornando possível a genotipagem precisa através da técnica de RFLP.

Em primeiro lugar, foram calculados os volumes necessários para preparar a solução Master Mix. Esta solução é constituída por água isenta de DNase/RNase, a enzima de restrição e o seu tampão específico.

Tabela 5 Preparação de amostras para discriminação de alelos utilizando a técnica RFLP

	Soluções	Valor de referência
Mistura principal	Enzima (SfcI, DdeI ou SphI)	1 µl
	Tampão específico para a enzima	3 µl
	H ₂ O sem DNase/RNase	4 µl
	V _{PCR(ADN)}	22 µl
	V _{final}	30 µl

O Master Mix foi preparado num tubo Eppendorf. Os volumes de cada componente foram determinados de acordo com o número total de amostras a analisar.

Distribuíram-se 5 µL desta solução de Master Mix nos diferentes minitubos Eppendorf de 0,5 ml correspondentes a cada amostra, com exceção do controlo negativo, obtendo-se um volume final de 30 µL por amostra (tendo em conta que tínhamos retirado 3 µL para o teste de eletroforese após a PCR).

Os tubos foram incubados durante a noite a 37°C para permitir a hidrólise do ADN pela enzima. Após a incubação, os fragmentos de ADN obtidos foram separados por eletroforese num gel de agarose a 3%.

Durante o período de estudo, foram utilizados vários géis, com 2 ou 3% de agarose e diferentes tamanhos (número de poços).

A preparação de um gel de agarose de 3% com 24 poços começou com a pesagem de 4,5 g de agarose em pó (SeaKem® LE Agarose) num balão Erlenmeyer. Em seguida, foram adicionados 150 ml de tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). A solução foi aquecida no micro-ondas até a agarose estar completamente dissolvida, obtendo-se uma

mistura homogênea e translúcida. Após arrefecimento, foram adicionados 7,5 µL de corante premium Green Safe. Este corante intercala-se entre as bases azotadas do ADN, tornando possível a visualização das bandas sob luz ultravioleta.

O gel ainda quente foi vertido para um molde equipado com pentes serrilhados, formando poços onde as amostras seriam depois depositadas. Após a solidificação do gel, os pentes foram retirados e o gel transferido para uma cuba de eletroforese horizontal contendo tampão TAE 1X, assegurando uma imersão completa.

Cada poço recebeu 15 µL de produto de PCR restrito.

Foi adicionado um marcador de peso molecular (NZYDNA Ladder VI) ao primeiro poço (7 µL). A eletroforese foi então efectuada a uma corrente de 100 mA. Por fim, as bandas de ADN foram visualizadas sob luz ultravioleta utilizando um transiluminador, o que permitiu avaliar o seu peso molecular comparando as posições das bandas de ADN e os pesos moleculares conhecidos do marcador.

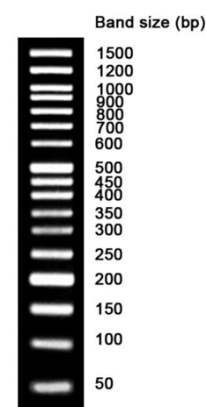


Figura 13 NZYDNA Ladder VI

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado para avaliar a distribuição dos genótipos na população estudada. De acordo com esse princípio, na ausência de forças evolutivas (como seleção, mutação, migração ou deriva genética), as frequências alélicas e genotípicas permanecem constantes ao longo das gerações (53). Para cada polimorfismo analisado, foram calculadas as frequências alélicas, e genotípicas esperadas determinadas com base na fórmula $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, onde p e q representam as frequências dos dois alelos. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada utilizando o software IBM SPSS Statistics (versão 30.0.0.0, IBM Corp., Armonk, NY, EUA). Os dados foram analisados para descrever a distribuição das variáveis, comparar grupos e avaliar correlações. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para um valor de $p < 0,05$.

Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Dado que os dados não apresentavam distribuição normal ($p < 0,05$), foram utilizados testes não paramétricos.

Foram utilizados modelos lineares generalizados (GLM) para a análise estatística, uma vez que as variáveis dependentes (não cumpriam o pressuposto da normalidade. A

maioria dos modelos foi estimada sob o pressuposto de uma distribuição gama com uma função de ligação logarítmica, adaptada a dados biológicos com assimetria positiva.

Foram construídos modelos iniciais completos para explorar associações entre preditores clínicos, demográficos e genéticos e cada variável dependente. As co variáveis incluíram a idade (variável contínua), o sexo, o estatuto de fumador (variável categórica: fumador/não fumador), bem como os genótipos da MMP-8 (-799 C/T e +17 C/G) e da MMP-9 (-1562 C/T). Quando apropriado, a redução do modelo foi aplicada para melhorar a parcimônia, retendo apenas os preditores que eram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) ou clinicamente relevantes. O ajuste e a significância dos efeitos foram avaliados usando testes de razão de verossimilhança e estatísticas de Wald (χ^2). As comparações entre pares foram ajustadas usando o método da diferença menos significativa (LSD).

Para analisar o efeito do estágio da periodontite (classificado de acordo com o sistema de estadiamento de 2018, estágio I-IV) nos marcadores enzimáticos e na profundidade de sondagem, foram utilizados modelos GLM separados, considerando o estágio como um preditor categórico. A idade foi incluída como uma co-variável nestes modelos, sempre que necessário, para controlar potenciais fatores de confusão. As médias marginais estimadas foram calculadas e comparadas entre os grupos através de contrastes de pares.

Os tamanhos dos efeitos são apresentados como coeficientes de regressão (B) com os respectivos erros padrão e intervalos de confiança de 95% de Wald. Para GLM com ligação logarítmica, os coeficientes exponenciados ($\text{Exp}(B)$) foram interpretados como efeitos multiplicativos. O diagnóstico do modelo incluiu o exame desvio residual, a estatística χ^2 de Pearson e os critérios de informação (AIC, BIC e CAIC) para avaliar a adequação do modelo.

A conformidade com o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificada por meio do teste do qui-quadrado (χ^2). A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico R 4.0 (pacote R baseado no teste do qui-quadrado, Statistical Computing and Graphics, Inc.).

III. Resultados

7. População estudada

A amostra do estudo foi composta por 62 pacientes, com idades entre 20 e 67 anos, divididos em dois grupos de acordo com o seu estado de saúde e critérios de inclusão: o grupo de teste, com 36 pacientes diagnosticados com periodontite, e o grupo de controlo, com 26 pacientes com saúde periodontal. A característica da população estudada encontra-se nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6 Características demográficas e clínicas da população geral estudada

Variável	Modalidade	Frequência (n)	Percentagem (%)
Sexo	Feminino	33	53,2
	Masculino	29	46,8
Estado de saúde	Saudável	26	42,0
	Fase I	1	1,6
	Fase II	9	14,5
	Fase III	17	27,4
	Fase IV	9	14,5
			58,0

Tabela 7 Características demográficas e clínicas da população dos dois grupos

Variável	Grupo saudável (n=26)	Grupo de teste (n=36)
Sexo	Feminino	15
	Masculino	11
Idade média (anos)	35 ± 11	52 ± 11
Profundidade média de sondagem (mm)	2 ± 1	6 ± 1
Volume médio de FCG recolhido (µl)	0,21 ± 0,12	0,57 ± 0,36

Todas as informações relativas aos dados de cada paciente, idade, sexo, localização de colheita de amostra, profundidade de sondagem e volume de FCG recolhido, estão apresentadas em forma de tabela em anexo (Anexo 6).

A idade média dos pacientes incluídos no estudo foi de 45 ± 14 anos, com um mínimo de 20 anos e um máximo de 67 anos. A distribuição por género mostrou uma predominância de mulheres (53,2%).

8. Genotipagem dos promotores dos genes MMP-8 e MMP-9

No âmbito do presente trabalho, foram analisadas as 8 amostras que, no estudo anterior, ainda não tinham sido processadas. Com a sua inclusão, foi possível completar a informação em falta e proceder à análise da totalidade das 62 amostras.

Para cada polimorfismo, os diferentes genótipos foram identificados com base no tamanho do fragmento, visualizado por eletroforese em gel de agarose a 3%. A figura 14 ilustra os resultados obtidos para várias amostras representativas.

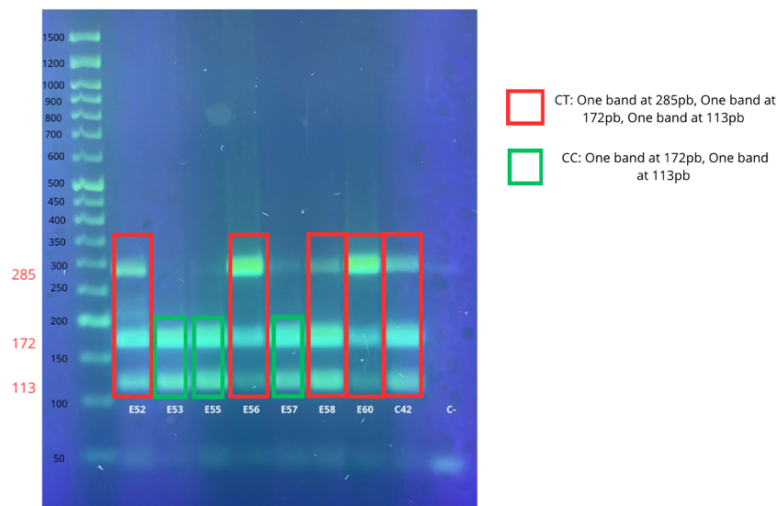


Figura 14 Exemplo de resultados da eletroforese dos produtos PCR após a técnica PCR-RFLP para as 8 amostras em falta relativamente aos polimorfismos MMP-8-799 (C/T)

Tabela 8 Resultados dos 8 análises genéticas

Código	Grupo	MMP-8-799(C/T)	MMP-8+17(C/G)	MMP-9-1562(C/T)
E52	Teste	CT	CC	CC
E53	Teste	CC	CC	CC
E55	Teste	CC	CC	CT
E56	Teste	CT	CG	CC
E57	Teste	CC	CC	CC
E58	Teste	CT	CC	CC
E60	Teste	CT	CC	CC
C42	Controlo	CT	CC	CC

As frequências alélicas e genóticas na população estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy–Weinberg para os três polimorfismos: MMP-8 -799(C/T) ($p=0,450$) MMP-8+17 (C/G) ($p=0,190$) e MMP-9-1562(C/T) ($p=0,400$).

Nas figuras 15, 16 e 17 são representadas as distribuições genóticas dos três polimorfismos MMP-8 -799(C/T) MMP-8+17 (C/G) e MMP-9-1562(C/T).

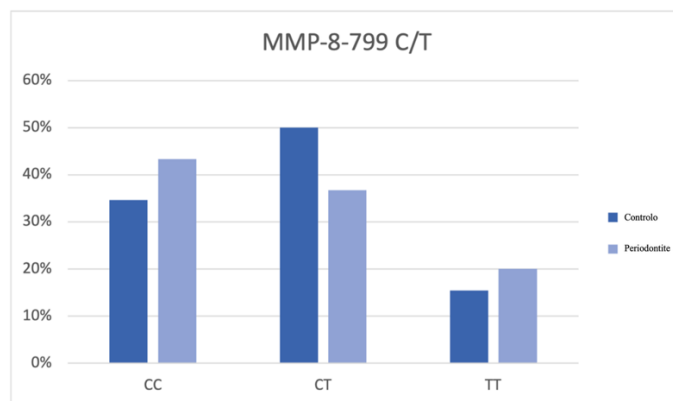


Figura 15 Distribuição genotípica do MMP-8 -799(C/T) na população estudada.

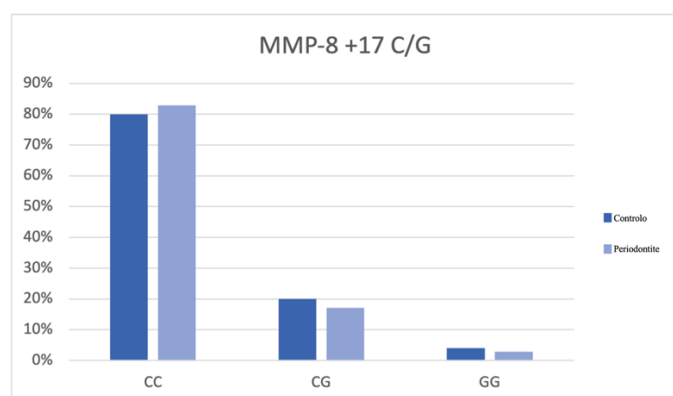


Figura 16 Distribuição genotípica do MMP-8 +17(C/G) na população estudada

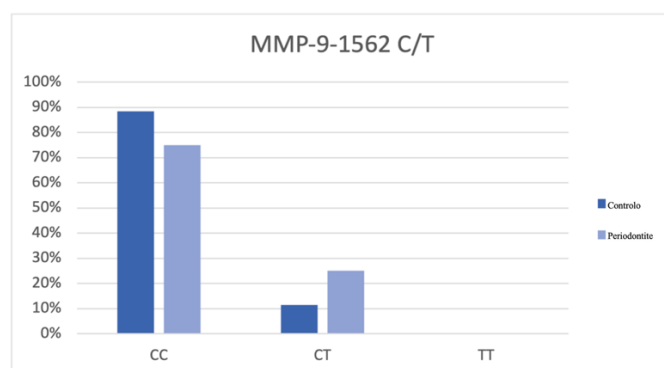


Figura 17 Distribuição genotípica do MMP-9 -1562(C/T) na população estudada.

A análise da frequência dos polimorfismos da MMP-8 e MMP-9 mostrou que as distribuições genóticas foram semelhantes entre o grupo saudável e o com periodontite.

O modelo usado para análise da associação verificou que os polimorfismos não foram significativamente associados à presença de periodontite (tabela 9):

Tabela 9 Resumo da análise estatística da associação dos polimorfismos a periodontite.

Variável	p-valor	Efeito significativo
Polimorfismo MMP-8-799(C/T)	0,452	Não
Polimorfismo MMP-8+17(C/G)	0,327	Não
Polimorfismo MMP-9-1562(C/T)	0,999	Não

9. Presença de MMP-8 no FCG

A concentração de MMP-8 foi avaliada para cada uma das amostras para explorar uma possível correlação entre os níveis detetados no FGC e a presença e gravidade da periodontite e os polimorfismos genéticos analisados. Neste trabalho foram analisadas 36 das 62 amostras recolhidas. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 10, e na tabela 11 encontram-se os resultados globais obtidos.

Tabela 10 Concentração de MMP-8 no FGC para as 36 amostras quantificadas neste trabalho

Amostras	MMP-8 no FGC (µg/ml)	Amostras	MMP-8 no FGC (µg/ml)
C19	2,2	E38	14,6
C20	0,2	E40	3,1
C21	0,9	E41	12,7
C30	0,5	E43	0,0
C31	2,3	E44	3,2
C32	3,6	E45	4,0
C33	3,9	E46	4,7
C36	5,1	E47	0,2
C37	0,7	E48	4,9
C39	2,0	E50	4,5
C42	1,7	E51	0,7
E20	2,2	E52	1,6
E32	4,5	E53	7,0
E33	5,4	E55	2,0
E34	1,1	E56	0,0
E35	5,5	E57	1,1
E36	0,5	E58	2,5
E37	1,7	E60	0,6

Tabela 11 Concentração total de MMP-8 (µg/ml) no FGC

	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
MMP-8 total no FGC (µg/ml)	4,6	3,3	4,7	0,2	20,4
Controlo (n=26)					
MMP-8 total no FGC (µg/ml)					
Periodontite (n=36)	3,5	2,7	3,3	0	14,6

Com estes dados verificamos que não há diferença estatística nos dois grupos. Os doentes com doença periodontal não tinham valores significativamente diferentes de MMP-8 total no seu FCG do que os doentes saudáveis. O modelo estatístico mostra que nem os hábitos tabágicos, nem a idade, nem os polimorfismos são preditores dos níveis de MMP-8. Por sua vez os níveis de MMP-8, quando ajustados a idade, também não estão associados ao diagnóstico ou a gravidades da periodontite.

Ao subdividir o grupo de indivíduos com doença periodontal por estágio (figura 18), também não são detetadas diferença estatística entre a concentração de MMP-8 total e os diferentes estádios da doença periodontal.

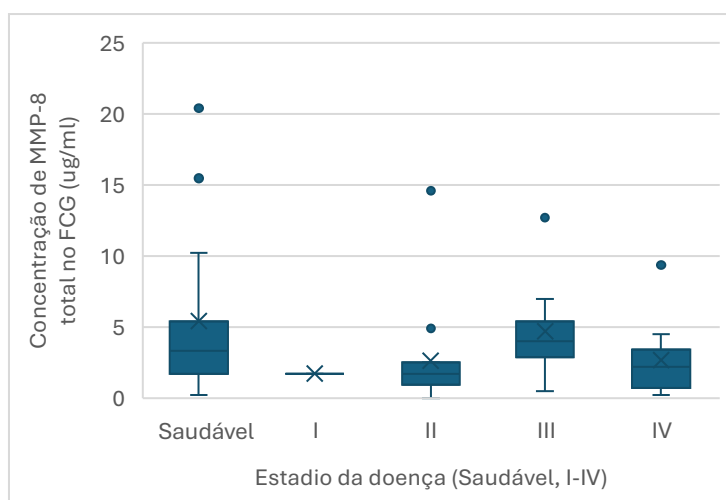


Figura 18 Concentração de MMP-8 por estágio da doença

Após a análise da MMP-8 total, realizámos também a análise da MMP-8 ativa com base nos dados recolhidos em trabalhos posteriores (46,47). A MMP-8 ativa é a fração de enzima capaz efetivamente de degradar colagénio. No entanto, os resultados são semelhantes aos anteriores e não se verificou qualquer associação entre os níveis de MMP-8 ativa medidos e a presença ou o estágio da periodontite.

De acordo com o modelo usado, a idade foi o único preditor significativo da presença de periodontite ($p=0,012$) e da sua gravidade ($p<0.001$).

10. Revelação das MMP ativas presentes no FCG

Para averiguar a ação das peptidases ativas que possam estar presentes no FGC, com capacidade de hidrólise de colagénio, foi realizada uma zimografia. Para esta zimografia foram selecionadas algumas amostras do controlo (C3B, C11A, C13B, C14B e C16B) e amostras de pacientes com periodontite (E11A, E11B, E14A, E18A, E19A,

E23A, E24A e E25A) e agrupadas para melhor evidenciar eventuais diferenças nos perfis de hidrólise.

Para cada um dos grupos foi quantificada a proteína total (tabela 12) e aplicada no gel a mesma quantidade (2,4 µg de proteína) para fins de comparação direta (figura 19).

Tabela 12 Concentração de proteína total em cada um dos grupos usados para zimografia

Concentração	
Controlo	177,5 µg/ml
Periodontite	119,0 µg/ml

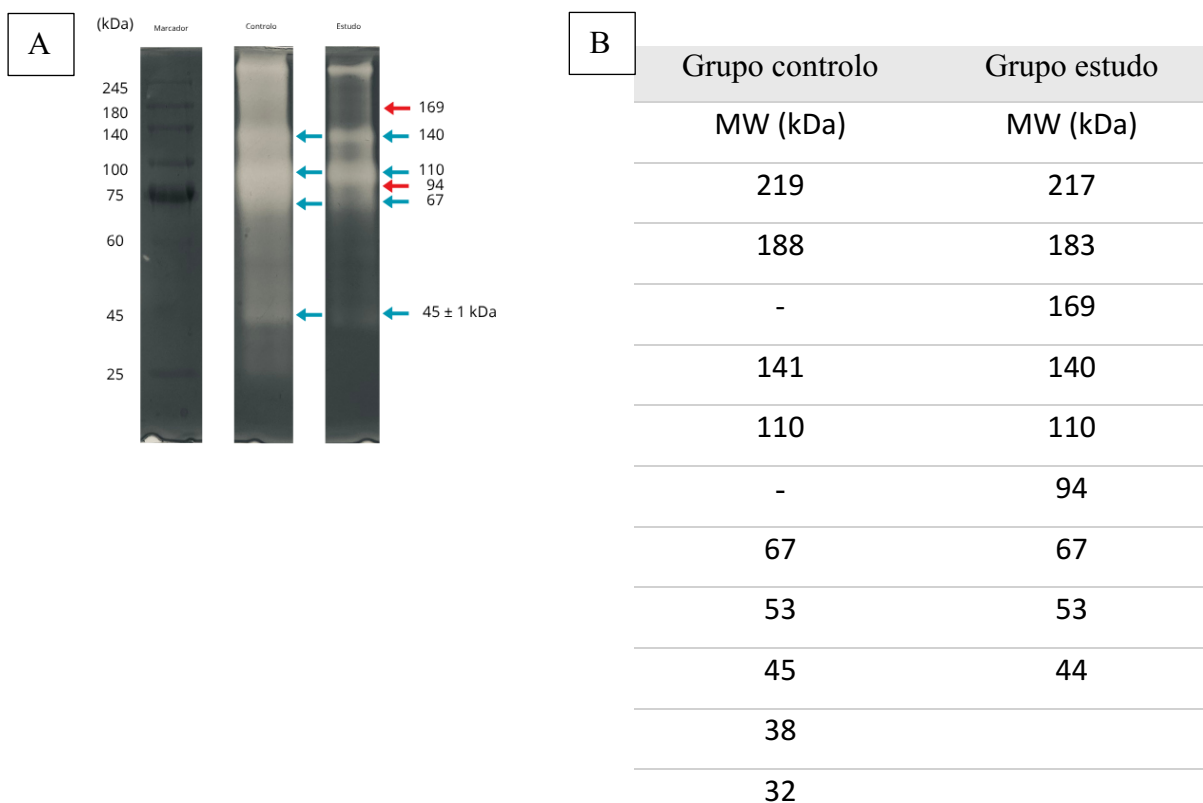


Figura 19 Resultado do gel de zimografia. A,- gel de zimografia B,- a análise que se seguiu com o software Fiji um traço indica a não deteção dessa banda

A análise do gel revela que a amostra de controlo tem um perfil de peptidases diferente da amostra dos indivíduos com doença periodontal. Observa-se uma maior intensidade de hidrólise de colagénio no caso da amostra controlo do que na amostra dos pacientes com periodontite. A análise por densitometria, permitiu identificar a massa molar das proteínas presentes nas zonas de hidrólise do colagénio (Figura 19 B). As principais diferenças são as presenças de bandas de 169 kDa e 94 kDa na análise do grupo estudo que não são visíveis no grupo controlo. É também evidente que a abundância de MMP de

massa molar elevada (acima de 100kDa) é maior no caso do controlo, embora esta gama seja de pouco interesse uma vez que inclui as peptidases nas suas pró-formas de são de maior massa molecular. A amostra de MMP-8 (previsivelmente com massa molecular cerca de 60kDa, dependendo do estado de glicosilação (54)) colocada no gel como controlo positivo não foi visível.

IV. Discussão

A degradação dos tecidos periodontais na doença periodontal envolve uma interação complexa entre os agentes patogénicos, a resposta imunitária do hospedeiro e os mediadores inflamatórios. Concentrámo-nos aqui nas MMP-8 e MMP-9 porque, de acordo com a literatura, estas metalopeptidases parecem desempenhar um papel central na degradação do colagénio da matriz e, consequentemente, na destruição dos tecidos.

Neste contexto, o objetivo do nosso estudo foi explorar a influência de polimorfismos genéticos da MMP-8 e MMP-9 e avaliar a presença e atividade da MMP-8 no fluido crevicular gengival de pacientes com periodontite e compará-los com pacientes saudáveis. As hipóteses avançadas envolviam a possível associação entre certas variações genéticas e uma maior suscetibilidade à doença bem como a potencial correlação entre a gravidade da doença e o aumento do nível das MMP.

A patogénese da periodontite é complexa e depende da suscetibilidade do hospedeiro e do desafio bacteriano específico. Embora as bactérias sejam consideradas os fatores iniciais da periodontite, o seu impacto pode ser modificado pela predisposição individual, que determina as manifestações associadas e a gravidade da doença. Uma substituição de um único nucleótido, de C para T, foi identificada nos promotores dos genes MMP-8 e 9 nas posições -799, e -1562, respetivamente (41,44) e de C para G no promotor de MMP-8 +17, diminuindo a afinidade de ligação de um repressor da transcrição (42) e, consequentemente um aumento no nível de proteínas produzidas pelas células, bem como da sua atividade em portadores do alelo T (41,42,44). Esta consequência pode levar a variabilidade entre indivíduos na predisposição a doenças complexas, como a periodontite. Os nossos resultados mostraram que as distribuições alélicas e genotípicas do grupo de indivíduos saudáveis e dos com periodontite não foram significativamente diferentes para nenhum dos polimorfismos estudados. Também não foi encontrada uma associação significativa do haplótipo com os dois SNP da MMP-8 associados. Em concordância, não foi encontrada diferença no nível de MMP-8 associado a cada um dos polimorfismos.

No entanto, a literatura aponta para a possível existência de diferenças na relação entre os polimorfismos e a periodontite entre subgrupos. As conclusões do estudo de caso-controlo de Murthykumar et al (2019) (nível de evidência III) corroboram as nossas (43). No entanto, o estudo de caso-controlo de Majumder P et al. (2019) (nível de evidência

III), realizado numa população indiana mostra evidências de uma associação significativa entre o polimorfismo da MMP-8 (-799C/T) e o aumento da suscetibilidade à periodontite crónica (55). A mesma variabilidade nas conclusões se verifica para o polimorfismo +17 C/G do gene MMP-8. Alguns estudos, como o de Majumder P et al. (2019), (nível de evidência III) relataram uma associação entre este polimorfismo e uma redução na suscetibilidade à doença periodontal crónica, particularmente quando acompanhado por um outro polimorfismo na MMP-13 (53). No entanto, outros estudos não encontraram uma ligação significativa entre o polimorfismo +17 C/G e o diagnóstico de periodontite, (44) e os nossos próprios resultados, que não confirmam associação entre esta variação genética e a doença.

Duas meta-análises que reagrupam diversos estudos individuais (56,57) identificaram uma associação significativa com maior risco de periodontite crónica, especialmente em populações asiáticas (58). Estudos realizados em pacientes caucasianos com periodontite crónica ou agressiva (República Tcheca, Turquia) não encontraram associação significativa (59). Da mesma forma, o polimorfismo +17 C/G da MMP-8 não demonstra associação clara com a doença, independentemente da população. No que diz respeito à MMP-9 (-1562 C/T), os resultados sugerem um efeito protetor contra a periodontite crónica em certas populações, particularmente asiáticas (60,61), enquanto nenhuma associação significativa foi observada para a periodontite agressiva ou em populações caucasianas (62,63). Estas divergências podem ser atribuídas ao tamanho das amostras, mas também às diferenças étnicas ou geográficas entre as populações estudadas. Além disso, as definições de periodontite nem sempre são uniformes, o que complica as comparações entre estudos (embora desde 2017 a definição se tenha tornado universal).

Assim, embora certos polimorfismos das MMP tenham sido associados à suscetibilidade à periodontite em alguns estudos, os nossos resultados, juntamente com os de outras investigações recentes, sugerem que não existe uma ligação clara e significativa entre estas variações genéticas e a periodontite. Para de facto se verificar uma alteração funcional com diferenças nos níveis e atividade das MMP, poderá ser necessário um haplótipo com um grupo de alterações genéticas mais alargada como se verificou no estudo em que apenas o conjunto de três alelos minor foi associado a resultados obstétricos (42).

Tal como se verificou para os polimorfismos também não encontramos uma associação entre os níveis de MMP-8 no FGC e a periodontite. A MMP-8 foi de facto

detetada no FGC, em todas as fases da doença, mas que a sua concentração não é significativamente diferente. Mesmo dentro do grupo de pacientes com doença periodontal, não parece haver diferença na expressão dessas mesmas metaloproteínas de acordo com os diferentes estádios da doença (I a IV).

Ao comparar vários estudos clínicos e revisões publicados entre 2018 e 2024, explorámos a ligação sugerida entre os níveis de MMP-8 no FCG e o estado periodontal. A maioria das pesquisas mostra uma associação significativa entre os níveis desses potenciais biomarcadores e a presença, gravidade ou progressão da doença periodontal. As revisões sistemáticas de De Moraes et al. (47) (Nível I) e de Gul et al. (48) (Nível I) apoiam esta tendência, mas sublinham a significativa heterogeneidade entre os estudos, quer em termos dos métodos utilizados, das amostras estudadas ou das diferentes fases de tratamento. Estas limitações questionam a utilidade destes potenciais biomarcadores num contexto clínico, enquanto sublinha a necessidade de uma abordagem cautelosa na sua interpretação.

Embora muita investigação continue a sugerir uma associação entre estes potenciais biomarcadores e a inflamação periodontal, um número crescente de estudos, particularmente aqueles com metodologias mais rigorosas, estão a começar a desafiar esta hipótese tal como apontam os nossos resultados. Os estudos de coorte de Dolińska et al. (2022, 2024) (nível de evidência II), apesar de protocolos bem definidos, não observaram variação significativa nas concentrações de MMP após o tratamento periodontal (64,65). Um outro estudo que avaliou os níveis de várias MMP no FGC antes e depois do tratamento não cirúrgico da periodontite, demonstrou que o nível de MMP-8 não apresentou diferença significativa entre as diferentes fases (pré e pós-tratamento), mesmo que o tratamento tenha mostrado melhorias reais no estado da doença (66).

Neste contexto, os nossos resultados fazem parte de uma tendência que questiona a utilização universal da MMP-8 como biomarcadores de diagnóstico. Destacam a importância de considerar estes biomarcadores com cautela, tendo em conta o contexto clínico como um todo. De acordo com o modelo utilizado, a idade é um forte preditor significativo da presença de periodontite. A idade acarreta alterações no sistema imunitário que determinam a resolução dos processos inflamatórios e de cicatrização de feridas.

As diferenças encontradas nos diversos estudos referidos podem ser explicadas por vários fatores como os métodos de análise utilizados, a não apresentação dos resultados relativizados ao volume de FGC que enviesam fortemente as conclusões, a detecção das isoformas ativas ou totais e a variabilidade das populações estudadas (comorbilidades, tratamentos em curso, fatores genéticos) e como observamos a idade dos participantes nos estudos. Além disso, os métodos de amostragem utilizados, que muitas vezes não são normalizados de um estudo para outro, podem também desempenhar um papel importante. Por último, a dimensão por vezes reduzida das amostras e a ausência de distinção por subtipo de periodontite limitam o alcance das conclusões.

Este estudo também tem limitações. Em primeiro lugar, a dimensão da amostra é relativamente pequena, o que pode ter reduzido o poder estatístico de algumas análises, nomeadamente no caso dos polimorfismos genéticos, em que as variações são muito pequenas. A seleção dos polimorfismos analisados centrou-se naqueles mais frequentemente descritos na literatura. No entanto, outras variantes genéticas potencialmente relevantes não foram consideradas neste estudo. Embora a idade média dos dois grupos considerados não seja muito diferente, poderá ter comprometido a robustez das análises efetuadas.

V. Conclusão

Os resultados obtidos mostram que, na população estudada, nem os polimorfismos selecionados nem os níveis de MMP-8 são preditores do diagnóstico de periodontite nem da sua gravidade. Também não foram encontradas associações entre os polimorfismos e os níveis de MMP-8 o que nos leva a rejeitar todas as hipóteses alternativas.

VI. Bibliografia

1. Merza RF, Aljohani RB, Alqahtani NS, Al-Sulami SBB, Sindi JA, Kabli RSY, et al. Oral Health and Systemic Disease: A systematic review of the impact of dental care on overall health. *Journal of Ecohumanism* [Internet]. 2024 Nov 11;3(7). Available from: <https://doi.org/10.62754/joe.v3i7.4679>
2. Santinoni CS, Magrin GL, Da Cruz ACC, Bianchini MA, Zimmermann GS, Benfatti CAM, et al. Periodontal Medicine: Impact of Oral health on General Health. *Qeios* [Internet]. 2024 Jan 18; Available from: <https://doi.org/10.32388/nmub5a>
3. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology* [Internet]. 2018 Jun 1;45(S20). Available from: <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>
4. Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. Summary of the WHO European Region. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/366987/9789289058988-eng.pdf>
5. SFPIO. La nouvelle classification des maladies et affections parodontales et péri-implantaires. . 2018 [cited 2025 Feb 4]. Société Française de Parodontologie et d'Implantologie Orale (SFPIO). Available from: <https://www.sfpio.com/informations-praticiens/la-nouvelle-classification-des-maladies-et-affections-parodontales-et-peri-implantaires/guides-pratiques-sur-la-nouvelle-classification-2.html>
6. Lang NP, Berglundh T, Giannobile WV, Sanz M. Lindhe's Clinical Periodontology and Implant Dentistry, 2 volume set. John Wiley & Sons; 2021.
7. Radzki D, Negri A, Kusiak A, Obuchowski M. Matrix metalloproteinases in the Periodontium—Vital in tissue turnover and unfortunate in periodontitis. *International Journal of Molecular Sciences*

- [Internet]. 2024 Feb 27;25(5):2763. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms25052763>
8. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *Journal of Periodontology* [Internet]. 2018 Jun 1;89(S1). Available from: <https://doi.org/10.1002/jper.16-0517>
 9. Tatakis DN, Kumar PS. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. *Dental Clinics of North America* [Internet]. 2005 Jun 23;49(3):491–516. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cden.2005.03.001>
 10. Abdulkareem AA, Al-Taweel FB, Al-Sharqi AJB, Gul SS, Sha A, Chapple ILC. Current concepts in the pathogenesis of periodontitis: from symbiosis to dysbiosis. *Journal of Oral Microbiology* [Internet]. 2023 Apr 2;15(1). Available from: <https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2197779>
 11. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology 2000* [Internet]. 2006 Aug 23;42(1):47–79. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00187.x>
 12. Huang N, Gibson FC. Immuno-Pathogenesis of periodontal Disease: current and emerging paradigms. *Current Oral Health Reports* [Internet]. 2014 Mar 21;1(2):124–32. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40496-014-0017-8>
 13. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiology* [Internet]. 2005 Nov 7;13(12):589–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.09.006>
 14. Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nature Reviews Immunology* [Internet]. 2021 Jan 28;21(7):426–40. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00488-6>
 15. Gross J, Lapiere CM. COLLAGENOLYTIC ACTIVITY IN AMPHIBIAN TISSUES: A TISSUE CULTURE ASSAY. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 1962 Jun 1;48(6):1014–22. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.48.6.1014>

16. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2009 Sep 9;27(31):5287–97. Available from: <https://doi.org/10.1200/jco.2009.23.5556>
17. Sagi I, Gaffney J. *Matrix Metalloproteinase Biology*. John Wiley & Sons; 2015.
18. Woolley DE, Glanville RW, Crossley MJ, Evanson JM. Purification of rheumatoid synovial collagenase and its action on soluble and insoluble collagen. *European Journal of Biochemistry* [Internet]. 1975 Jun 1;54(2):611–22. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb04173.x>
19. Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA, Eisen AZ. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1986 May 1;261(14):6600–5. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)84605-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)84605-7)
20. Thomas JT, Joseph B, Waltimo T, Anil S. Matrix metalloproteinases (MMPs) in periodontium: Is it a boon or a bane? In: *Dentistry* [Internet]. 2024. Available from: <https://doi.org/10.5772/intechopen.114353>
21. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular Aspects of Medicine* [Internet]. 2008 Jun 4;29(5):290–308. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.002>
22. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [Internet]. 2017 Jan 1;1–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>
23. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* [Internet]. 2006 Jan 6;69(3):562–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>
24. Kar S, Subbaram S, Carrico PM, Melendez JA. Redox-control of matrix metalloproteinase-1: A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respiratory Physiology &*

- Neurobiology [Internet]. 2010 Sep 1;174(3):299–306. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.08.019>
25. Jones GT. Matrix metalloproteinases in biologic samples. *Advances in Clinical Chemistry* [Internet]. 2014 Jan 1;199–219. Available from: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800141-7.00007-3>
26. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontologica Scandinavica* [Internet]. 2006 Oct 18;65(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1080/00016350600963640>
27. Sorsa T, Gursoy UK, Nwhator S, Hernandez M, Tervahartiala T, Leppilähti J, et al. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontology 2000* [Internet]. 2015 Dec 10;70(1):142–63. Available from: <https://doi.org/10.1111/prd.12101>
28. Luchian I, Goriuc A, Sandu D, Covasa M. The role of matrix metalloproteinases (MMP-8, MMP-9, MMP-13) in Periodontal and Peri-Implant pathological processes. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2022 Feb 4;23(3):1806. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms23031806>
29. Tschesche H, Wenzel H. Neutrophil collagenase. In: Elsevier eBooks [Internet]. 2012. p. 725–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382219-2.00153-8>
30. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* [Internet]. 2010 Apr 1;141(1):52–67. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>
31. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [Internet]. 2007 Feb 23;8(3):221–33. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrm2125>
32. Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* [Internet]. 2007 Aug 20;82(6):1375–81. Available from: <https://doi.org/10.1189/jlb.0607338>

33. Z EA, K SS, Neuman KC, Gregory G I. Matrix metallopeptidase 9/Gelatinase b. In: Elsevier eBooks [Internet]. 2012. p. 754–63.
Available from: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382219-2.00157-5>
34. Augoff K, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R, Stach K. MMP9: a tough target for targeted therapy for cancer. *Cancers* [Internet]. 2022 Apr 6;14(7):1847. Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers14071847>
35. Huang N, Gibson FC. Immuno-Pathogenesis of periodontal Disease: current and emerging paradigms. *Current Oral Health Reports* [Internet]. 2014 Mar 21;1(2):124–32. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40496-014-0017-8>
36. Zhang L, Li X, Yan H, Huang L. Salivary matrix metalloproteinase (MMP)-8 as a biomarker for periodontitis. *Medicine* [Internet]. 2018 Jan 1;97(3):e9642. Available from: <https://doi.org/10.1097/md.00000000000009642>
37. Lee HS, Kim WJ. The Role of Matrix Metalloproteinase in Inflammation with a Focus on Infectious Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2022 Sep 11;23(18):10546. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms231810546>
38. Da Silva-Neto PV, Valle VBD, Fuzo CA, Fernandes TM, Toro DM, Fraga-Silva TFC, et al. Matrix Metalloproteinases on Severe COVID-19 Lung Disease Pathogenesis: Cooperative Actions of MMP-8/MMP-2 Axis on Immune Response through HLA-G Shedding and Oxidative Stress. *Biomolecules* [Internet]. 2022 Apr 19;12(5):604. Available from: <https://doi.org/10.3390/biom12050604>
39. Leaché AD, Oaks JR. The utility of single nucleotide polymorphism (SNP) data in phylogenetics. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* [Internet]. 2017 Nov 2;48(1):69–84. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110316-022645>
40. Teama S. DNA Polymorphisms: DNA-Based molecular markers and their application in medicine. In: *InTech eBooks* [Internet]. 2018. Available from: <https://doi.org/10.5772/intechopen.79517>
41. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* [Internet]. 1999 Jul 1;234(2):177–86. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00219-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00219-x)

42. Wang H, Parry S, Macones G, Sammel MD, Ferrand PE, Kuivaniemi H, et al. Functionally significant SNP MMP8 promoter haplotypes and preterm premature rupture of membranes (PPROM). *Human Molecular Genetics* [Internet]. 2004 Sep 14;13(21):2659–69. Available from: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh287>
43. Murthykumar K, Varghese S, Priyadharsini JV. Association of MMP8 (-799C/T) (rs11225395) gene polymorphism and chronic periodontitis [Internet]. Vol. 11, *Drug Invention Today* |. 2019. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/334491738>
44. Putri H, Sulijaya B, Hartomo BT, Suhartono AW, Auerkari EI. +17 C/G polymorphism in matrix metalloproteinase (MMP)-8 gene and its association with periodontitis. *Journal of Stomatology* [Internet]. 2020 Jan 1;73(4):154–8. Available from: <https://doi.org/10.5114/jos.2020.98310>
45. Ostrovskaya L, Beybulatova D, Zakharova N, Katkhanova L, Lysov A, Heigetyan A, et al. GINGIVAL FLUID AS a POTENTIAL OBJECT FOR DIAGNOSTICS PROCESS. *Archiv Euromedica* [Internet]. 2020 Jun 29;10(2):104–6. Available from: <https://doi.org/10.35630/2199-885x/2020/10/2.27>
46. Sarkar P, Muthuraj TS, Bandyopadhyay P, Ghosh P. Matrix metalloproteinase-9-1562 C/T promoter gene polymorphism in chronic periodontitis: A cross-sectional observational study. *Journal of Indian Society of Periodontology* [Internet]. 2022 Jul 1;26(4):348–52. Available from: https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_80_21
47. De Moraes EF, Pinheiro JC, Leite RB, Santos PPA, Barboza C a. G, Freitas RA. Matrix metalloproteinase-8 levels in periodontal disease patients: A systematic review. *Journal of Periodontal Research* [Internet]. 2017 Sep 12;53(2):156–63. Available from: <https://doi.org/10.1111/jre.12495>
48. Gul SS, Zardawi FM, Abdulkareem AA, Shaikh MS, Al-Rawi NH, Zafar MS. Efficacy of MMP-8 level in gingival crevicular fluid to predict the outcome of nonsurgical periodontal treatment: a systematic review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*

- [Internet]. 2022 Mar 7;19(5):3131. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijerph19053131>
49. Rato C. A metaloproteinase 8 como biomarcador na doença periodontal - estudo piloto [Master thesis]. Egas Moniz School of Sciences; 2022.
 50. Ferreira M. A metaloproteinase 9 como biomarcador na doença periodontal - estudo piloto [Master thesis]. Egas Moniz School of Sciences; 2023.
 51. Almeida I. Associação do polimorfismo do promotor do gene da metaloproteinase 8 com a periodontite - estudo piloto [Master thesis]. Egas Moniz School of Sciences; 2023.
 52. Hernández M, Gamonal J, Tervahartiala T, Mäntylä P, Rivera O, Dezerega A, et al. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. *Journal of Periodontology* [Internet]. 2010 Jul 23;81(11):1644–52. Available from: <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100196>
 53. Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Science* [Internet]. 1908 Jul 10;28(706):49–50. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.28.706.49>
 54. Bencsik P, Bartekova M, Görbe A, Kiss K, Pálóczi J, Radosinska J, et al. MMP activity detection in zymograms. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2017 Jan 1;53–70. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4_6
 55. Majumder P, Ghosh S, Dey SK. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms in chronic periodontitis: a case–control study in the Indian population. *Journal of Genetics* [Internet]. 2019 Mar 1;98(1). Available from: <https://doi.org/10.1007/s12041-019-1077-2>
 56. Li W, Zhu Y, Singh P, Ajmera DH, Song J, Ji P. Association of Common Variants in MMPs with Periodontitis Risk. *Disease Markers* [Internet]. 2016 Jan 1;2016:1–20. Available from: <https://doi.org/10.1155/2016/1545974>
 57. Weng H, Yan Y, Jin YH, Meng XY, Mo YY, Zeng XT. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and periodontitis susceptibility: a

- meta-analysis involving 6,162 individuals. Scientific Reports [Internet]. 2016 Apr 20;6(1). Available from: <https://doi.org/10.1038/srep24812>
58. Chou Y, Ho Y, Lin Y, Hu K, Yang Y, Ho K, et al. MMP-8 -799 C>T genetic polymorphism is associated with the susceptibility to chronic and aggressive periodontitis in Taiwanese. Journal of Clinical Periodontology [Internet]. 2011 Oct 4;38(12):1078–84. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.2011.01798.x>
59. Holla LI, Hrdlickova B, Vokurka J, Fassmann A. Matrix metalloproteinase 8 (MMP8) gene polymorphisms in chronic periodontitis. Archives of Oral Biology [Internet]. 2011 Sep 15;57(2):188–96. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.08.018>
60. Li G, Yue Y, Tian Y, Li JL, Wang M, Liang H, et al. Association of matrix metalloproteinase (MMP)-1, 3, 9, interleukin (IL)-2, 8 and cyclooxygenase (COX)-2 gene polymorphisms with chronic periodontitis in a Chinese population. Cytokine [Internet]. 2012 Jul 21;60(2):552–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.06.239>
61. Loo WTY, Wang M, Jin LJ, Cheung MNB, Li GR. Association of matrix metalloproteinase (MMP-1, MMP-3 and MMP-9) and cyclooxygenase-2 gene polymorphisms and their proteins with chronic periodontitis. Archives of Oral Biology [Internet]. 2011 Apr 19;56(10):1081–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.03.011>
62. Keles GC, Gunes S, Sumer AP, Sumer M, Kara N, Bagci H, et al. Association of matrix metalloproteinase-9 promoter gene polymorphism with chronic periodontitis. Journal of Periodontology [Internet]. 2006 Sep 1;77(9):1510–4. Available from: <https://doi.org/10.1902/jop.2006.050378>
63. Holla LI, Fassmann A, Mužík J, Vanek J, Vasku A. Functional polymorphisms in the matrix metalloproteinase-9 gene in relation to severity of chronic periodontitis. Journal of Periodontology [Internet]. 2006 Oct 31;77(11):1850–5. Available from: <https://doi.org/10.1902/jop.2006.050347>
64. Dolińska E, Pietruska M, Dymicka-Piekarska V, Milewski R, Sculean A. Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) and Interleukin-8 (IL-8) in

- Gingival Crevicular Fluid after Regenerative Therapy in Periodontal Intrabony Defects with and without Systemic Antibiotics—Randomized Clinical Trial. *Pathogens* [Internet]. 2022 Oct 14;11(10):1184. Available from: <https://doi.org/10.3390/pathogens11101184>
65. Dolińska E, Skurska A, Dymicka-Piekarska V, Milewski R, Pietruska M. Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) and Interleukin-8 (IL-8) in Gingival Crevicular Fluid after Minimally Invasive Periodontal Surgery with or without Er:YAG and Nd:YAG Laser Application. *Antibiotics* [Internet]. 2024 Jul 27;13(8):704. Available from: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13080704>
66. Kim HN. Changes in salivary matrix metalloproteinase-3, -8, and -9 concentrations after 6 weeks of non-surgical periodontal therapy. *BMC Oral Health* [Internet]. 2022 May 13;22(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s12903-022-02185-3>

VII. Anexos

Anexo.1 Aprovação pela comissão ética

Comissão de Ética EGAS MONIZ



Proc. Interno nº 922

Ex.ma Senhora
Profª. Doutora Madalena Oom

Monte de Caparica, 25 de fevereiro de 2021.

Ex.ma Senhora,

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

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Profª. Doutora Maria  Fernanda de Mesquita

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

Anexo.2 Declaração da direção clínica



Declaração da Direção Clínica para Autorização para realização de trabalho de projeto de investigação na Clínica Dentária Egas Moniz

Identificação do investigador responsável: Maria Madalena Seabra de Oliveira Salema Cordeiro Oom

Título do Projeto: MMP89POLYACT- Relationship between metalloproteinases 8 and 9 promoter gene polymorphisms, protein activity and periodontitis susceptibility in a Portuguese population.

Excelentíssima Professora Doutora Fernanda de Mesquita,

O investigador Ricardo de Almeida Castro Alves responsável pela tarefa *Clinical diagnosis of periodontitis and collection of the biological samples* no projeto MMP89POLYACT, financiado ao abrigo do programa Egas Moniz/ CiiEM Investiga, e os estudantes de MIMD a fazer o trabalho de projeto final associados ao mesmo projeto podem utilizar a Clínica Dentária Egas Moniz (CDEM), para sua realização.

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, 15 de janeiro de 2021

Direção Clínica

Assinado por: **JOSÉ JOÃO BALTAZAR MENDES**
Num. de Identificação: BI095286012
Data: 2021.01.18 17:29:34 +0000



Anexo.3 Questionário para seleção dos pacientes



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

Questionário para seleção dos participantes

Proc nº: _____ Código de amostra: _____

Sexo: F __ / M __

Idade: _____

Nº de dentes: _____

Periodontite: SIM ☐ NÃO ☐

Gravidez ou amamentação: SIM ☐ NÃO ☐ NÃO Aplicável ☐

Aparelho ortodôntico: SIM ☐ NÃO ☐

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

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

se sim, Qual? _____

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

A Preencher pelo Coordenador do Projeto de investigação:

Cumpr critérios de Inclusão SIM ☐ NÃO ☐

Anexo.4 Periodontograma



CRU JEGAS MONIZ
CLINICAL RESEARCH UNIT

PERIODONTOGRAMA
Prof. Doutor Ricardo Alves

Legenda

Índice de Placa e Gingival- Apontar nas faces dentárias V, L, M, D, representadas pelos círculos

Mobilidade - Grau 1- 1 / Grau 2- 2 / Grau 3- 3

Lesão de Furca - Grau 1- 1 / Grau 2- II / Grau 3- III

Hemorragia à Sondagem - círculo a vermelho à volta do valor de PS

Margem Gingival: Valor Negativo (-) para Recessão Gingival, Valor positivo (+) para Aumento de Volume Gingival, Valor (0) Margem coincidente com a JAC, Margem sem alterações

medição do sulco Valor (+) (de 1 a 3mm)

Para Cálculo da NIP= PS-(-RG) ou (+AV)

Data: ___/___/20___ Proc.nº _____

Nome: _____

Data Nascimento : ___ - ___ - ___ Fumador: Sim ☐ Não ☐ Cigarros/dia: _____

Antecedentes: _____

Medicação crónica: _____

IP _____ % IG _____ % Diagnóstico Periodontal ☐ Reavaliação Periodontal ☐ TPS ☐

Diagnóstico Periodontal: _____

Mobilidade																	
Margem gengival																	
Sondagem																	
Dente	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	
Lesão de Furca																	

Identificar os implantes com espiras a vermelho



IP																	
IG																	

Dente	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	
Sondagem																	
Margem gengival																	

Mobilidade.																	
Margem gengival																	
Sondagem																	
Dente	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	
Lesão de Furca																	

Identificar os implantes com espiras a vermelho



IP																	
IG																	

Dente	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	
Sondagem																	
Margem gengival																	

Anexo.5 Consentimento informado

**Consentimento Informado**

Código | IMP:EMLPE.17_03

Monte de Caparica, __de _____de _____

Exmo.(a) Sr.(a),

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

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

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

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

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

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

(Riscar o que não interessa)

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

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

Anexo.6 **Informações sobre os participantes com saúde periodontal
e as amostras dos grupos**

Grupo Controlo

Código de amostra	Grupo	Idade	Género	Local de recolha	Profundidade de sondagem	Volume do fgc (uL)
C.01.A	Saudável	23	F	36 MV	2	0,12
C.02.B	Saudável	21	F	36 MV	2	0,17
C.03.A	Saudável	23	M	11 MV	2	0,32
C.05.B	Saudável	28	F	36 MV	3	0,18
C.06.A	Saudável	26	M	11 MV	2	0,27
C.08.B	Saudável	33	M	36 MV	2	0,24
C.09.A	Saudável	27	F	11 MV	2	0,35
C.10.B	Saudável	34	M	36 MV	2	0,14
C.11.A	Saudável	29	F	11 MV	3	0,26
C.12. A	Saudável	30	M	11 MV	1	0,11
C.13.B	Saudável	46	F	46 MV	3	0,44
C.14.B	Saudável	58	F	46 MV	3	0,1
C.16.B	Saudável	31	F	36 MV	2	0,29
C.19.A	Saudável	31	M	11 MV	3	0,25
C.20.A	Saudável	63	F	11MV	1	0,48
C.21.A	Saudável	43	F	11MV	2	0,14
C.22.B	Saudável	36	M	36 MV	2	0,08
C.23.B	Saudável	28	F	VM	3	0,1
C.30.A	Saudável	20	F	11MV	1	0,45
C.31.A	Saudável	40	M	11MV	2	0,14
C.32.A	Saudável	33	M	11MV	1	0,2
C.33.A	Saudável	53	F	11MV	1	0,08
C.36.A	Saudável	39	F	11MV	1	0,12
C.37.A	Saudável	43	F	11MV	1	0,12
C.39.A	Saudável	35	M	11MV	2	0,12
C.42.A	Saudável	36	M	11MV	2	0,14

Grupo Estudo

Código de amostra	Grupo	Idade	Género	Local de recolha	Profundidade de sondagem	Volume do fgc (uL)
E.03.B	Periodontite	67	F	12 MV	9	1,24
E.04.B	Periodontite	60	F	26 DV	5	1,24
E.05.B	Periodontite	53	F	31 DV	5	0,66
E.06.A	Periodontite	66	F	43 MV	5	1,02
E.11.A	Periodontite	46	M	41 MV	6	0,89
E.18.A	Periodontite	58	M	48 ML	12	0,98
E.19.A	Periodontite	57	F	43 MV	8	0,41
E.20.A	Periodontite	63	F	VM	.	1
E.23.A	Periodontite	63	F	33 DV		0,81
E.24.A	Periodontite	48	M	32 DV	8	1,23
E.25.A	Periodontite	45	F	21 CV	7	0,71
E.26.B	Periodontite	55	F	17 PC	8	0,79
E.32.A	Periodontite	40	F	26 MV	5	0,29
E.33.A	Periodontite	45	M	11MV	6	0,45
E.34.A	Periodontite	30	M	47 MP	6	0,44
E.35.A	Periodontite	48	F	44 MV	7	0,52
E.36.A	Periodontite	35	F	17 DP	8	0,87
E.37.A	Periodontite	45	F	17 MV	5	0,19
E.38.A	Periodontite	46	M	17 DV	6	0,3
E.40.A	Periodontite	57	M	41 MV	8	1,0
E.41.A	Periodontite	67	M	16 MV	5	0,19
E.43.A	Periodontite	24	M	17 MP	5	0,1
E.44.A	Periodontite	57	M	45 DV	8	1,01
E.45.A	Periodontite	44	M	16 MV	6	0,3
E.46.A	Periodontite	66	M	11 MV	5	0,29
E.47.A	Periodontite	52	F	42 DV	6	0,25
E.48.A	Periodontite	48	M	41 MV	5	0,2
E.50.A	Periodontite	65	M	25 DV	5	0,19
E.51.A	Periodontite	58	M	42 DV	6	0,45
E.52.A	Periodontite	50	F	24 DP	7	0,57
E.53.A	Periodontite	61	F	16 MV	6	0,31
E.55.A	Periodontite	56	F	16 DP	7	0,58
E.56.A	Periodontite	60	M	36 DV	5	0,09
E.57.A	Periodontite	34	M	17 DP	6	0,27
E.58.A	Periodontite	58	M	14 MV	5	0,1
E.60.A	Periodontite	58	F	26 MP	8	0,75

Anexo.7 Consentimento informado



Consentimento Informado

Código | IMP:EM.17_03

Monte de Caparica, __de ____de ____

Exmo.(a) Sr.(a),

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

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

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

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

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

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

(Riscar o que não interessa)

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

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

Anexo.8 Resumo participação 7ºcongresso Ciiem 2025

Rethinking MMP-8 as a Biomarker in Periodontitis: Evidence from Genetic and Protein

Expression analysis

Yohan Ragné¹, João Trincão¹, Mariana Ferreira¹, Catarina Rato¹, Inês Martins¹ e Margarida Esteves¹, Paulo Mascarenhas², Ricardo Alves², Isabel Barahona², Ana Clara Ribeiro², Madalena Salema-Oom²

¹Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM), Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal

²Egas Moniz Center for Interdisciplinary Research (CiiEM), Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal

Periodontitis is a chronic, multifactorial inflammatory disease, whose clinical diagnosis is often made at an advanced stage, by which time the destruction of the supporting tissues has already begun. The onset and progression of the disease may be related to polymorphisms in genes of proteins responsible for the destruction of the periodontium ligament such as matrix metalloproteinases (MMPs). Single nucleotide polymorphisms in the promoter region may influence the binding of regulatory factors, thereby resulting in alterations to mRNA and protein levels. Several studies have been conducted examining the correlation between MMP-8 (-799C>T) and MMP-8 (+17 C>G) Single nucleotide polymorphisms along with the levels of MMP-8 enzyme with the risk of developing periodontitis. However, the findings from these studies have not yet reach a consensus. The objective of this study was two-fold: firstly, to explore the relationship between genetic traits in the MMP-8 gene (MMP-8-799, MMP-8+17) and, secondly, the levels of MMP-8 as detected in gingival crevicular fluid in relation to the occurrence of periodontitis, validating these levels as biomarker to early diagnostic. The study population comprised 62 patients of whom 36 were diagnosed with periodontitis and 26 exhibited healthy periodontal tissue, thus forming the test and control groups, respectively. The gingival crevicular fluid samples were collected using paper strips, and the concentrations of MMP-8 were then measured using an ELISA kit. Concurrently, buccal mucosa cells were collected from the same patients using swabs, with the subsequent extraction of DNA. The analysis of polymorphisms was conducted by PCR and RFLP followed by electrophoresis. Generalised linear models (gamma distribution, log link) were employed to analyse non-normally distributed outcomes (PD, total and active MMP-8). The models incorporated variables such as age, sex, smoking habits, and MMP-8 polymorphisms. Non-significant terms were excluded unless they demonstrated clinical relevance. The effects of disease stage effects were assessed in age-adjusted models. The model's fit was assessed through the utilisation of likelihood ratios, Wald statistics, and AIC/BIC. The results obtained are expressed as B coefficients and exponentiated B (Exp(B)), with pairwise contrasts utilising the least significant difference correction. The results provide no evidence to suggest a significant association between the periodontitis susceptibility and each of the polymorphisms or with the genotype analysed. Furthermore, no correlation was identified between the concentration of MMP-8 or concentration of active MMP-8 and periodontitis. These findings reinforce a trend that has been observed in the recent literature, which highlights the limitations of MMP-8 as a standalone diagnostic biomarker. In the present model, age is the only factor significantly associated with active MMP-8 levels, with a slight but statistically significant negative effect, suggesting a gradual reduction in enzyme activity with ageing, which may reflect age-related immune changes. These results give rise to questions regarding the use of MMP-8 as a biomarker for periodontal disease, suggesting the necessity for further studies with larger sample sizes and the inclusion of other matrix metalloproteinases in the research scope.

Key Words: “Biomarker”; “Gingival Crevicular Fluid”; “MMP-8”; “Periodontitis”

RETHINKING MMP-8 AS A BIOMARKER IN PERIODONTITIS: EVIDENCE FROM GENETIC AND PROTEIN EXPRESSION ANALYSIS

Yohan Ragné¹, João Trincão¹, Mariana Ferreira¹, Catarina Rato¹, Inês Martins¹, Margarida Esteves¹, Paulo Mascarenhas², Ricardo Alves², Isabel Barahona², Ana Clara Ribeiro², Madalena Salema-Oom²

¹Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM), Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal

²Egas Moniz Center for Interdisciplinary Research (CiiEM), Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal

INTRODUCTION

The periodontium is a dynamic structure whose main role is to support the tooth and the oral mucosa, and is influenced by local, environmental, and systemic factors (1,2). Periodontitis is a chronic, multifactorial inflammatory disease affecting the soft and hard tissues of the periodontium, which can lead to irreversible damage (2). Clinical diagnosis is often made at an advanced stage, by which time the destruction of the supporting tissues has already begun (1). According to the latest WHO global report on the state of oral health, severe periodontal disease is a public health issue affects nearly 19% of the population that is, one billion people (3). Genetic polymorphisms in matrix metalloproteinases (MMPs), particularly MMP-8, may influence the progression of the periodontal disease. Single nucleotide polymorphisms in promoter regions can alter gene expression. Several studies have explored the link between MMP-8 polymorphisms (-799C>T, +17C>G), enzyme levels, and periodontitis risk, findings remain inconclusive (4,5,6).

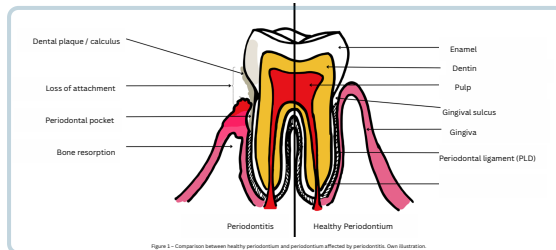


Figure 1 - Comparison between healthy periodontium and periodontium affected by periodontitis. Own illustration.

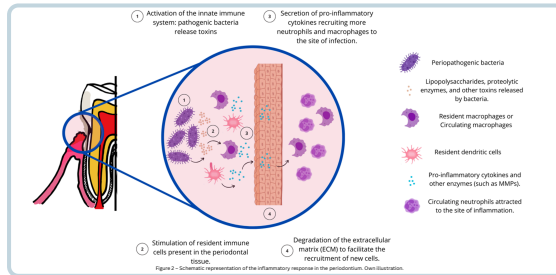


Figure 2 - Schematic representation of the inflammatory response in the periodontium. Own illustration.

AIMS

This study investigated the potential of MMP-8 as an early diagnostic biomarker for periodontitis by analysing its concentration in gingival crevicular fluid as well as the presence of two gene polymorphisms (-799C>T and +17C>G). The aim was to assess whether these molecular markers are associated with disease presence, severity, or susceptibility.

METHODOLOGY

A total of 62 individuals were included: 36 with periodontitis and 26 healthy controls. Gingival crevicular fluid samples were collected using paper strips for MMP-8 quantification via ELISA and zymography analysis. Buccal swabs were used for DNA extraction and analysis of MMP-8 gene polymorphisms by PCR-RFLP. Generalised linear models (gamma distribution, log link) were applied to assess the association between clinical and molecular variables, adjusting for age, sex, smoking, and disease stage. Model fit was evaluated using likelihood ratios, Wald tests, and AIC/BIC.

RESULTS

The results provide no evidence to suggest a significant association between the periodontitis susceptibility and each of the polymorphisms or with the genotype analysed. Furthermore, no correlation was identified between the concentration of MMP-8 or concentration of active MMP-8 and periodontitis. These findings reinforce a trend that has been observed in the recent literature, which highlights the limitations of MMP-8 as a standalone diagnostic biomarker. In the present model, age is the only factor significantly associated with a positive effect in the diagnosis of periodontitis. Age has also a slight, yet statistically significant, negative effect on active MMP-8 levels. This suggests a gradual reduction in enzyme activation with ageing. These results reflect age-related immune changes.

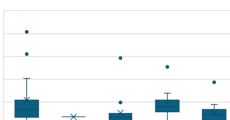
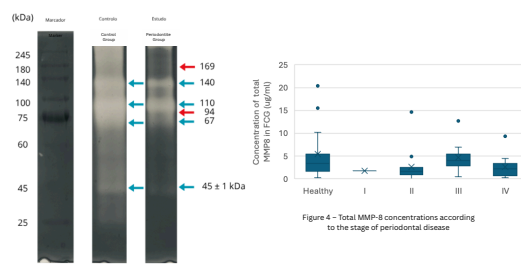


Figure 4 - Total MMP-8 concentrations according to the stage of periodontal disease

Figure 3 - Zymography results for the analysis of collagenolytic activity.

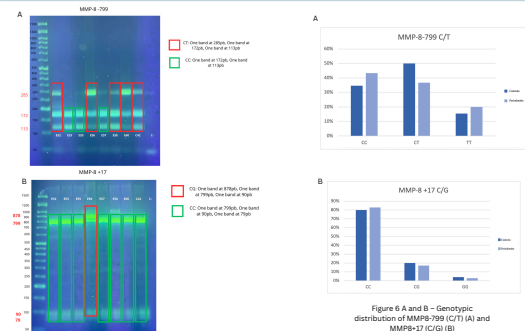


Figure 5 A e B - Photograph of the results of two versions of the electrophoresis performed following the PCR and RFLP techniques for MMP-8-799 (A) and MMP-8+17 (B).

Figure 6 A and B - Genotypic distribution of MMP-8-799 (C/T) (A) and MMP-8+17 (C/G) (B)

CONCLUSION

These results give rise to questions regarding the use of MMP-8 as a biomarker for periodontal disease, suggesting the necessity for further studies with larger samples sizes and the inclusion of other matrix metalloproteinases in the research scope.

REFERENCES

To access the bibliography, please scan this QR code.

