



UNIVERSIDADE
CATÓLICA
PORTUGUESA | INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE

Glico-OralOma na periimplantite

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para obtenção do
grau de Mestre em Medicina Dentária*

Por:

Nuno André Fernandes Costa

VISEU, 2013



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Glico-OralOma na periimplantite

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de mestre em Medicina Dentária

Sob a orientação da Professora Doutora Marlene Maria Tourais de Barros e a co-orientação do Professor Doutor Bruno José Manadas

Por:

Nuno André Fernandes Costa

VISEU, 2013

“O objetivo não é ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo a gente vê.”

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Marlene Barros,

orientadora deste trabalho, pelo apoio, disponibilidade, conhecimentos transmitidos e pelo constante estímulo para ir mais além e fazer sempre melhor. Obrigado pela motivação e calma que transmite.

Ao Professor Doutor Bruno José Manadas,

meu co-orientador.

Ao Professor Doutor Nuno Rosa,

pelo valioso apoio, disponibilidade, troca de impressões e comentários ao longo da realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria José Correia,

pela disponibilidade e ajuda prestada.

Aos meus pais,

pelo amor incondicional, pela forma como me inculcaram a alegria de viver e por estarem sempre comigo. Obrigado!

À minha irmã e ao Pedro,

pelo carinho, amor e pela confiança que transmitem para a realização dos meus sonhos.

À Lídia,

companheira dos bons e maus momentos, pelo inestimável apoio, paciência, preocupação e compreensão reveladas ao longo destes anos.

À Beatriz,

minha afilhada, por me proporcionar momentos de pura felicidade.

Ao Vítor,

meu binómio, pela amizade, apoio e pelos 5 fantásticos anos de convívio repletos de bons momentos.

Ao Diogo Marinho,

pela amizade, incentivo e apoio incondicional.

Aos meus amigos David Costa, Virgílio China, Jorge Ribeiro e Cristina Ferreira,

pela amizade e pelos excelentes momentos partilhados.

Aos meus amigos e colegas de curso,

Por marcarem de forma tão positiva o meu percurso académico.

RESUMO

Apesar da ênfase da medicina dentária preventiva nos últimos anos, continua a ser elevado o número de indivíduos parcial ou totalmente desdentados, necessitando de tratamentos que devolvam a funcionalidade. Nesse sentido, a implantologia tem-se tornado a área de eleição para que esses problemas sejam minimizados, proporcionando uma melhor qualidade de vida. A periimplantite, uma falha tardia dos implantes dentários, é definida como um processo inflamatório que afeta os tecidos circundantes de um implante osteointegrado em função, resultando na perda de osso de suporte. Esta patologia tem consequências tanto a nível económico como na saúde oral dos pacientes. Assim, urge identificar os mecanismos moleculares que estão envolvidos nesta patologia.

O objetivo deste trabalho consiste em identificar as proteínas alteradas e as glicoproteínas cuja atividade possa ser modificada, de modo a identificar não só os processos moleculares que se encontram comprometidos na periimplantite, mas também esclarecer o contributo da flora que está presente de forma diferenciada nesta patologia.

Recorrendo à biomedicina computacional, foi possível tratar dados no sentido de equacionar razões moleculares subjacentes à periimplantite.

O estabelecimento do proteoma da periimplantite possibilitou adicionar 39 proteínas à base de dados OralCard, permitindo pela primeira vez compilar informação relativamente à periimplantite nesta base de dados. A caracterização funcional do OralOma da periimplantite permitiu identificar alterações em determinadas funções moleculares, processos biológicos e vias de sinalização. Não foi possível determinar o GlicOralOma devido à escassez de informações. Relativamente ao microbioma da periimplantite verificou-se existir escassez de estudos nesta área, sendo apenas identificados 5 géneros como aumentados na periimplantite. De igual forma, verificou-se uma escassez de dados que permitissem estabelecer relações com a periimplantite aquando da análise de interactómica.

Este trabalho permitiu elucidar mecanismos moleculares que levam à perda óssea em redor do implante, o que poderá permitir o estabelecimento de alvos para futuros estudos experimentais e de novas abordagens na intervenção clínica na periimplantite.

Palavras-chave: Periimplantite, Biomedicina Computacional, Proteoma, OralCard, Microbioma.

ABSTRACT

Despite the increased emphasis on preventive dentistry in recent years, remains high the number of partial or total edentulous people, requiring treatments that restore functionality. Therefore, implantology has become the main area of specialisation for these problems to be minimized, recovering quality of life. Peri-implantitis, the late failure of the dental implant, is an inflammatory process affecting the tissues surrounding an osseointegrated implant in function, resulting in the loss of supporting bone. This pathology has consequences both economically and in the oral health of patients. Thus, it is urgent to identify the molecular mechanisms that are involved on it.

The aim of this work is to identify altered proteins and glycoproteins whose activity can be modified, in order to identify not only the molecular processes that are engaged in peri-implantitis, but also to clarify the contribution of flora that is present in different ways in this pathology.

Using the computational biomedicine, it was possible to process data in order to equate molecular reasons underlying peri-implantitis.

Establishing periimplantitis proteome allowed to add 39 proteins to OralCard database, making possible for the first time to compile periimplantitis information in this database. Functional characterization of the peri-implantitis OralOma led to identify changes in certain molecular functions, biological processes and signaling pathways. It was not possible to determine the Glyco-OralOme due to lack of information. Regarding the peri-implantitis microbiome it was noted the lack of studies in this area, being only identified five genders as increased in peri-implantitis. Similarly, there was a paucity of data that would allow establishing relationships with peri-implantitis when of the interactomics examination.

This work helped to clarify the molecular mechanisms that lead to bone loss around the implant, which may allow the establishment of targets for further experimental studies and new approaches in clinical intervention in peri-implantitis.

Keywords: Peri-implantitis, Computational Biomedicine, Proteome, OralCard, Microbiome.

NOTA PRÉVIA

Nesta dissertação aparecem, por vezes, expressões em língua Inglesa, escritas em *itálico*, de modo a manter a uniformização universal dos termos usados para descrever conceitos biológicos, entre culturas e línguas diferentes. A tradução destas expressões poderia distorcer o seu significado original e alterar o conceito biológico que se pretende identificar.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| IMPLANTES | 3 |
| <i>Definição</i> | 3 |
| <i>Anatomia</i> | 3 |
| <i>Reabilitação com implantes</i> | 4 |
| <i>Osteointegração</i> | 5 |
| <i>Eventos osso-implante</i> | 5 |
| PATOLOGIAS PERIIMPLANTARES | 8 |
| <i>Definição</i> | 8 |
| <i>Sinais e diagnóstico</i> | 8 |
| <i>Remodelação óssea</i> | 11 |
| MICROBIOMA DA PERIIMPLANTITE | 13 |
| PROTEOMA NA PERIIMPLANTITE | 14 |
| O INTERACTOMA ORAL HUMANO-MICROBIANO | 15 |
| GLICÓMICA | 16 |
| OBJETIVOS | 19 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 23 |
| ORALOMA HUMANO DA PERIIMPLANTITE | 25 |
| <i>Anotação manual dos dados relativos às proteínas presentes e alteradas em Periimplantite</i> | 25 |
| <i>Caracterização do proteoma da Periimplantite</i> | 30 |
| <i>Comparação com o OralOma normal</i> | 31 |
| <i>Identificação de potenciais interações proteína-proteína</i> | 32 |
| <i>Glico-OralOma</i> | 35 |
| MICROBIOMA ORAL DE PERIIMPLANTITE | 36 |
| <i>As proteínas bacterianas produzidas pelo microbioma em Periimplantite</i> | 37 |
| <i>Enzimas microbianas com atividade de glicosilação/desglicosilação</i> | 38 |
| INTERACTOMA DO MICROBIOTA E O PROTEOMA HUMANO EM PERIIMPLANTITE | 40 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |
| ORALOMA HUMANO DA PERIIMPLANTITE | 43 |
| <i>As proteínas presentes e alteradas</i> | 43 |
| <i>Proveniência da amostra</i> | 46 |

| | |
|--|----|
| <i>Relação com estado de saúde-doença</i> | 47 |
| <i>Métodos de recolha e análise</i> | 50 |
| <i>Características especiais</i> | 50 |
| CARACTERIZAÇÃO DO PROTEOMA DA PERIIMPLANTITE | 52 |
| <i>Funções moleculares das proteínas da periimplantite</i> | 52 |
| <i>Processos biológicos das proteínas da periimplantite</i> | 54 |
| <i>Vias de sinalização das proteínas de periimplantite</i> | 55 |
| COMPARAÇÃO COM O ORALOMA NORMAL | 57 |
| <i>Comparação das funções moleculares</i> | 57 |
| <i>Comparação dos processos biológicos</i> | 58 |
| <i>Comparação das vias de sinalização</i> | 59 |
| IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA ... | 61 |
| GLICO-ORALOMA DA PERIIMPLANTITE | 70 |
| <i>Composição</i> | 72 |
| INTERACTOMA HUMANO-MICROBIANO DA CAVIDADE ORAL NA PERIIMPLANTITE | 76 |
| ENZIMAS COM ATIVIDADE GLICOSÍDICA PRODUZIDAS PELOS MICRORGANISMOS | 81 |
| TRATAMENTO DA PERIIMPLANTITE | 82 |
| CONCLUSÃO | 83 |
| BIBLIOGRAFIA | 87 |
| ANEXOS | 99 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Cabeçalhos que permitem a organização da informação recolhida dos diferentes estudos de proteómica da cavidade oral (proteínas identificadas na periimplantite anotadas manualmente) numa tabela em Microsoft Excel 2013..... | 26 |
| Figura 2 - Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2013 relativa à origem identificação das proteínas da periimplantite anotadas manualmente | 26 |
| Figura 3 - Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2013 relativa à origem das proteínas da periimplantite anotadas manualmente..... | 26 |
| Figura 4 - Interface da ferramenta Diagrama de Venn após a inserção dos dados das três listas a intersectar..... | 27 |
| Figura 5 - Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2013 referente à relação das proteínas anotadas da periimplantite com os estados de saúde e doença | 27 |
| Figura 6 - Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2013 referente à caracterização do indivíduo dador da amostra | 28 |
| Figura 7 - Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2013 referente aos métodos de recolha e análise das proteínas da periimplantite | 29 |
| Figura 8 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2013 referente às características especiais das proteínas da periimplantite..... | 29 |
| Figura 9 - Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2013 relativa à informação dos estudos que permitiram a recolha das proteínas da periimplantite anotadas manualmente | 29 |
| Figura 10 - Interface do sistema de análise em grupo da ferramenta de classificação do PANTHER. As opções seleccionadas correspondem às definições utilizadas para analisar os conjuntos de proteínas anotados na periimplantite | 30 |
| Figura 11 - Seleção do tipo de classificação desejado, interface da ferramenta PANTHER..... | 31 |
| Figura 12 –Página inicial e de input da ferramenta STRING | 33 |
| Figura 13 – Página de seleção e confirmação das proteínas inseridas, ferramenta STRING..... | 33 |
| Figura 14 – Rede de interactómica gerada pelo STRING, as diferentes cores das linhas representam a fonte de informação..... | 34 |
| Figura 15 – Relação das cores que unem as proteínas na rede interactómica gerada pelo STRING com a sua fonte de informação | 34 |

| | |
|--|----|
| Figura 16 - Seleção do tipo de ontologia desejado, interface da ferramenta STRING. | 35 |
| Figura 17 - Cabeçalhos que permitem a organização da informação recolhida dos diferentes estudos de microbiologia da cavidade oral (microrganismos identificadas na periimplantite anotadas manualmente) numa tabela em Microsoft Excel 2013..... | 36 |
| Figura 18 – Interface da página inicial do UniProtKB..... | 37 |
| Figura 19 – Interface da página de pesquisa avançada do UniProtKB | 38 |
| Figura 20 – Interface da página inicial da ferramenta BRENDA | 39 |
| Figura 21 - Diagrama de Venn representativo da distribuição das proteínas segundo a sua origem | 47 |
| Figura 22 - Gráfico representativo da distribuição das proteínas da periimplantite anotadas na ontologia “Molecular Function” do PANTHER..... | 52 |
| Figura 23 - Gráfico da distribuição das proteínas da periimplantite anotadas no nível 1 da ontologia “Molecular Function” do PANTHER na função catalytic activity | 53 |
| Figura 24 - Gráfico da distribuição das proteínas da periimplantite anotadas no nível 2 da ontologia “Molecular Function” do PANTHER na função hydrolase | 54 |
| Figura 25 - Gráfico representativo da distribuição das proteínas da periimplantite anotadas na ontologia “Biological Process” do PANTHER | 55 |
| Figura 26 - Gráfico da distribuição das proteínas da periimplantite anotadas na ontologia “Pathway” do PANTHER | 56 |
| Figura 27 - Distribuição das proteínas identificadas em pacientes com periimplantite segundo as funções moleculares em que intervêm, recorrendo à ferramenta PANTHER. É mostrada a diferença fracional entre as proteínas da periimplantite e o OralOma normal. As barras com coloração verde indicam as funções moleculares com uma alteração em relação ao OralOma normal considerada estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$). | 57 |
| Figura 28 - Distribuição das proteínas identificadas em pacientes com periimplantite segundo os processos biológicos em que intervêm, recorrendo à ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003) . É mostrada a diferença fracional entre as proteínas da periimplantite e o OralOma normal. As barras com coloração verde indicam os processos biológicos com uma alteração em relação ao OralOma normal considerada estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$). | 58 |
| Figura 29 - Distribuição das proteínas identificadas em pacientes com periimplantite segundo as vias de sinalização em que intervêm, recorrendo à ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003) . É mostrada a diferença fracional entre as proteínas da | |

| | |
|---|----|
| periimplantite e o OralOma normal. As barras com coloração verde indicam as vias de sinalização com uma alteração em relação ao OralOma normal considerada estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$). | 59 |
| Figura 30 - Rede interatômica das proteínas identificadas na periimplantite (Confidence > 0,9). Imagem gerada pela ferramenta STRING | 61 |
| Figura 31 - Proteínas que estão identificadas na via de sinalização da apoptose identificada na rede interactiva das proteínas identificadas na periimplantite. | 62 |
| Figura 32 - Proteínas que estão identificadas na via de sinalização das MAPK identificada na rede interactiva das proteínas identificadas na periimplantite. | 64 |
| Figura 33 Proteínas que estão identificadas no processo biológico que regulam positivamente as cascatas de MAPK identificada na rede interactiva das proteínas identificadas na periimplantite..... | 64 |
| Figura 34 - Proteínas que estão identificadas no processo biológico que regulam as cascatas de JNK, identificada na rede interactiva das proteínas identificadas na periimplantite..... | 65 |
| Figura 35 - Proteínas que estão identificadas no processo biológico que regulam positivamente as cascatas de ERK1 e ERK2 pela via de sinalização mediada por TNFSF11 (RANKL), identificada na rede interactiva das proteínas identificadas na periimplantite..... | 65 |
| Figura 36 - Esquema dos processos implicados na diferenciação, reabsorção e sobrevivência dos osteoclastos. | 68 |
| Figura 37 - Número de proteínas produzidas por cada género de microrganismo e a sua capacidade de glicosilação, identificadas nos estudos que identificaram o microbioma da periimplantite. | 74 |
| Figura 38 - Número de proteínas com EC Number 2.4 e 3.2 identificadas nos estudos que identificaram o microbioma da periimplantite..... | 75 |
| Figura 39 - Interações das proteínas bacterianas produzidas pelo género actinomyces da periimplantite (coloração a vermelho) com as proteínas humanas orais (coloração a verde), gerada através do algoritmo OralInt, cuja visualização foi realizada com recurso à ferramenta Cytoscape | 76 |
| Figura 40 - Interações das proteínas bacterianas produzidas pelo género campylobacter da periimplantite (coloração a vermelho) com as proteínas humanas orais (coloração a verde), gerada através do algoritmo OralInt, cuja visualização foi realizada com recurso à ferramenta Cytoscape | 78 |

Figura 41 - Interações das proteínas bacterianas produzidas pelo género streptococcus da periimplantite (coloração a vermelho) com as proteínas humanas orais (coloração a verde), gerada através do algoritmo OralInt, cuja visualização foi realizada com recurso à ferramenta Cytoscape 79

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Proteínas identificadas na periimplantite..... | 43 |
| Tabela 2 – Proteínas humanas da periimplantite que sofrem Glicosilções noutros tecidos, que não os da cavidade oral..... | 70 |
| Tabela 3 – Géneros de microorganismos aumentados em periimplantite em relação ao estado saudável..... | 72 |
| Tabela 4 – Proteínas bacterianas do género actinomyces identificadas que interagem com proteínas orais humanas..... | 77 |
| Tabela 5 – Proteínas bacterianas do género campylobacter identificadas que interagem com proteínas orais humanas..... | 78 |
| Tabela 6 – Proteínas bacterianas orais com capacidade glicosídica..... | 81 |

LISTA DE ABREVIATURAS

(A ordem utilizada para a apresentação das abreviaturas prende-se com o seu emprego ao longo do texto).

FGFs – Fibroblast Growth Factor

BMPs – Bone Morphogenic Protein

OPG – Osteoprotegerina

RANK – Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A

RANKL – Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11

PPI – Interação proteína-proteína

PTM – Modificações pós-traducional

AGE - Advanced Glycation End-product

PANTHER – Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships

IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology

TNF- α – Tumor Necrosis Factor alpha

IL-6 - Interleukin 6

IL-1 β - Interleukin 1 Beta

ECM – Extracellular matrix

MMP – Matrix metalloproteinase

NO – Óxido nítrico

MMP-8 – Matrix metalloproteinase 8

TNFR1 – Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A

TNFR2 – Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase

JNK – c-Jun N-terminal Kinase

ERK 1 – Extracellular signal-Regulated Kinase 1

ERK2 – Extracellular signal-Regulated Kinase 2

TNFSF11 – Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11

JNK1 – c-Jun N-terminal Kinase 1

JNK 2 – c-Jun N-terminal Kinase 2

JNK 3 – c-Jun N-terminal Kinase 3

UV – Ultravioleta

TRAF – TNF Receptor Associated Factor

TRAF-6 – TNF Receptor Associated Factor 6

NF-KB – Nuclear factor-Kappa B

I-KB – Inhibitor of Kappa Light Chain Gene Enhancer in B-Cells

IKK – I-KappaB Kinase

TAK1 – TGF-Beta Activated Kinase

NIK – NF-KappaB-Inducing Kinase

MKK7 – Map Kinase Kinase 7

TNFR – Tumor Necrosis Factor Receptor

AP1 – Activating Protein-1

NFAT – Nuclear Factor of Activate T-Cells

TCF – Ternary Complex Factor

MITF – Micophthalmia-Associated Transcription Factor

XIAP – Xenopus Inhibitor of Apoptosis

cIAP – Inhibitor of Apoptosis Protein

PI3K – Phosphatidylinositol-3 Kinase

Akt1 – RAC-alpha serine/treonine-protein kinase

PYK2 – Protein tyrosine Kinase-2

INTRODUÇÃO

IMPLANTES

Definição

Um implante é um componente de titânio que substitui a raiz natural de uma ou mais peças dentárias, aquando da reabilitação oral. O conceito básico da implantologia oral, a osteointegração, consiste na união fisiológica entre o implante e o osso. Esta união ocorre devido à biocompatibilidade existente entre o titânio e o organismo humano, abrindo a porta para uma importante modalidade de reabilitação oral, a implantologia. (1)

Anatomia

Os tecidos moles que rodeiam os implantes são, quanto à sua estrutura e composição, muito semelhantes aos que rodeiam os dentes naturais. O tecido mole supra-crista que rodeia os implantes, denominado mucosa periimplantar, forma em torno do implante uma estrutura semelhante ao sulco gengival, denominado sulco periimplantar. Este tecido é coberto na sua vertente interna pelo epitélio do sulco e por um epitélio de união, enquanto na sua vertente externa é coberto por um epitélio oral que pode ser queratinizado ou simplesmente por mucosa alveolar. Entre as células mais apicais do epitélio de união e do osso alveolar, encontra-se uma zona de tecido conjuntivo que também entra em contacto direto com a superfície do implante, denominada lâmina própria. Há, contudo, diferenças a salientar entre os dois tipos de tecidos descritos, as quais de seguida se expõem por referência às suas idiossincrasias morfológicas. (1)

A primeira diferença regista-se ao nível do epitélio do sulco. Este é um tecido celular poli-estratificado, similar ao que encontramos ao redor de um dente. Porém, enquanto ao redor dos dentes esse tecido tem sempre uma espessura mínima de mucosa queratinizada (0,5 mm), devido ao potencial indutor do ligamento periodontal, nos implantes é possível encontrar ausência completa de mucosa queratinizada, provavelmente devido à ausência desse mesmo ligamento (1).

Do mesmo modo, há diferenças ao nível do epitélio de união. Este tecido forma um selamento mucoso com cerca de 2 mm de altura que atua como uma barreira à invasão da zona de osteointegração por bactérias e toxinas orais. As células epiteliais que se unem à superfície de titânio são idênticas às que se inserem na superfície dos dentes naturais (2). O

epitélio de união ao redor do implante é muito semelhante em composição e dimensões ao que existe no dente. As células epiteliais estão unidas entre si por desmossomas e estas por sua vez unem-se à superfície do implante através de hemidesmossomas e da lâmina basal (lâmina densa que está em contacto com o titânio e lâmina lúcida). Contudo, alguns autores apresentam a hipótese de que a união do titânio seja química entre as glicoproteínas hemidesmossómicas e o óxido de titânio (3).

Por fim, há ainda diferenças quanto à lâmina própria. Consiste numa zona de tecido conjuntivo formado por uma rede tridimensional de fibroblastos, fibras de colagénio e vasos sanguíneos de 1,5 mm de altura. Vários estudos observaram que se tratava de um tecido conjuntivo com características cicatriciais que o diferencia do seu homólogo do periodonto, rico em fibras de colagénio e pobre em fibroblastos (1, 4, 5). As fibras de colagénio possuem uma orientação paralela à superfície de titânio e dispõem-se de forma circular, oblíqua ou de cervical para apical, o que confere tonicidade à mucosa. Estas fibras inserem-se apenas no conjuntivo gengival e no osso alveolar, não existindo fibras de características equivalentes às dento-gengivais, dento-alveolares e trans-epiteliais. Da mesma forma, mediante análise imuno-histoquímica foi possível determinar uma proporção maior de colagénio tipo V nos tecidos periimplantares que poderia ser responsável pela defesa do tecido contra uma possível agressão bacteriana devido a uma maior resistência à colagenase (6). Na fase precoce de cicatrização, os fibroblastos segregam glicosaminoglicanos, ácido hialurónico e heparino-sulfato que vão recobrir a superfície do implante. Mais tarde segregam fibronectina que une as fibras de colagénio aos glicosaminoglicanos dispostos na superfície do implante. Quanto à vascularização, demonstrou-se que a do tecido conjuntivo periodontal é mais rica que a do conjuntivo periimplantar (6).

Reabilitação com implantes

Os implantes osteointegrados foram recebidos com ceticismo pela comunidade académica devido à falta de estudos longitudinais sobre os mesmos (7). O primeiro conceito de reabilitação oral por intermédio da osteointegração de implantes endo-ósseos do sistema Bränemark, data de 1977, por intermédio de Per-Ingvar Bränemark, que reabilitou mandíbulas desdentadas com implantes (8).

Com a aplicação dos implantes osteointegrados, tornou-se possível a reabilitação de doentes com situações clínicas que até esse momento, não podiam ser resolvidas de forma satisfatória. Hoje em dia o termo osteointegração é sinónimo de sucesso em implantologia (7).

Osteointegração

O fenômeno de osteointegração foi descoberto acidentalmente por Bränemark e seus colaboradores, sendo este termo utilizado pela primeira vez, em 1985 (9). Em 1990, Bränemark redefiniu a sua proposta inicial, elucidando esta como: “uma coexistência funcional e estrutural contínua entre tecidos biológicos diferenciados adequadamente remodelados e componentes sintéticos que providenciam funções clínicas específicas e duradouras sem iniciar qualquer mecanismo de rejeição” (10).

A osteointegração é um processo contínuo provocado pela atividade funcional, adaptativa e reparadora dos osteoblastos e dos osteoclastos, sendo este mecanismo designado de *coupling* (10).

Os osteoblastos são de origem mesenquimal e são responsáveis pela deposição de novo osso de modo a manter a massa óssea apropriada para o stress exercidos sobre o esqueleto (11). A diferenciação dos osteoblastos é influenciada por diversos fatores de crescimento locais como as FGFs (*Fibroblast Growth factor*), as BMPs (*Bone Morphogenic protein*) e as Wnt proteins, mas requerem também a transcrição de Runx2 e de fatores de transcrição da osterix (12). Por sua vez, os osteoclastos são células que reabsorvem osso, funcionando em articulação com os osteoblastos. Estes, devido à secreção de osteoprotegerina (OPG) inibem a reabsorção óssea (10).

Os osteócitos surgem na nova matriz óssea comunicando com outras células ósseas através de inúmeros canalículos. Apesar das suas funcionalidades serem parcialmente desconhecidas acredita-se que esta rede celular esteja relacionada com a reabsorção óssea e ainda com a percepção da carga pelo osso (10).

Eventos osso-implante

No interface osso-implante ocorrem uma série de eventos sequenciais (10).

Logo após a colocação de um implante começa por se formar uma camada aquosa, que facilita a adsorção das proteínas e outras moléculas na superfície do implante (13).

A partir dos trinta segundos e nas horas seguintes, a superfície do implante é coberta por uma camada de proteínas da matriz extracelular, provenientes do sangue, dos fluidos provenientes da ferida cirúrgica e da atividade celular periprotética. A composição e

disposição desta camada de células está dependente da topografia da superfície com que se deparam (13). Uma superfície rugosa melhora o processo de osteointegração e aumenta o *attachment* (10).

Ao fim de poucas horas, dá-se interação das células com a superfície dos implantes através da camada de proteínas adsorvidas. Inicia-se assim a adesão celular, migração e diferenciação, durante vários dias (14). Para além da topografia do implante, esta fase é ainda regulada por células ligadas à superfície, proteínas do citoesqueleto, características químicas, iões químicos libertados pela superfície e proteínas da matriz extracelular (10).

A matriz extracelular é uma via de transporte de informação, a partir de proteínas como o colagénio I, fibronectina, trombospondina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea e ainda algumas proteínas do plasma, que funcionam como mediadores do *attachment* celular e participam nas interações célula-célula e célula-proteína (13, 15). Além disso, a matriz extracelular contém informação que vai influenciar a forma das células, a organização do citoesqueleto, a polaridade e motilidade celular, a expressão génica, a sua proliferação e a sobrevivência (10).

Relativamente ao *attachment* celular, ocorre através de integrinas, adesão focal e filopodia. As integrinas são recetores transmembranares da superfície celular que medeiam o contacto físico das células com a matriz exterior (10). A adesão focal conecta a matriz extracelular ao citoesqueleto da célula e é o processo utilizado em superfícies lisas (16). A filopodia consiste em extensões celulares (*footpads*) ricas em actina, que promovem a adesão da célula às superfícies rugosas (16).

No primeiro dia, depois da criação da ferida num local intacto, dá-se a resposta imune, neovascularização e recrutamento de células osteoprogenitoras para posterior diferenciação em odontoblastos. Ocorre adsorção molecular de água e plaquetas, as quais participam na segregação de fatores de crescimento para promoção da adesão dos osteoblastos à superfície do implante (adesão focal) e formação de uma nova matriz óssea (10).

Ao fim de três dias, as células em torno do implante ativam os osteoblastos relacionados com fatores de transcrição (RunX2 e Op) (17). No quarto dia, o osso necrótico criado durante a cirurgia é reabsorvido e cria-se um interface bem definido (10). No dia seguinte surgem evidências de formação de novo osso e correspondente atividade da fosfatase alcalina, indicando o começo de remineralização e remodelação da matriz (10).

Após uma semana, a adesão da matriz óssea na superfície do implante é facilmente distinguida e a matriz extracelular penetra nas cavidades da superfície (10).

No décimo sexto dia, a superfície do implante é amplamente coberta e integrada numa mistura de tecido mineralizado, osteoide e matriz densa (10).

Após quatro semanas, existe contacto direto com o osso ao longo de toda a superfície do implante. As fibras de colagénio paralelas à superfície do implante e os osteoblastos constituem a maior parte da camada de tecido adjacente. Células e proteínas da matriz extracelular e tecido ósseo mineralizado encontram-se assim em contacto direto com o osso (18).

No que concerne à formação óssea, parece ocorrer em duas direções: da superfície do implante para o osso e do osso para a superfície do implante, sendo respetivamente, osteogénese de contacto e à distância (13, 19).

Na osteogénese de contacto, a taxa de formação óssea é mais rápida (13). A superfície do implante é colonizada por células ósseas, antes de se iniciar a formação da matriz, processo designado por formação óssea *de novo* (20).

Na osteogénese à distância, o novo osso não se forma na superfície do implante, mas fica rodeado de osso, em processos semelhantes ao que ocorre na cicatrização do osso cortical (10).

Ao fim de doze semanas, o novo osso formado fica integrado na superfície do implante, havendo um contacto íntimo entre o osso lamelar maduro e a superfície do implante de titânio (10).

PATOLOGIAS PERIIMPLANTARES

Definição

De acordo com o 1º Workshop Europeu de Periodontologia (1993), a patologia periimplantar foi definida como uma reação inflamatória com perda do osso de suporte nos tecidos circundantes a um implante em função (21).

Contudo, é importante realizar uma distinção entre falhas precoces e tardias dos implantes dentários. Uma falha precoce ocorre durante o período correspondente à osteointegração do implante dentário, ao passo que uma falha tardia ocorre após o processo de osteointegração. A mucosite periimplantar e a periimplantite constituem falhas tardias nos implantes dentários (22).

Mucosite periimplantar

A mucosite periimplantar tem sido definida como uma reação inflamatória reversível na mucosa periimplantar circundante a um implante dentário osteointegrado (21).

Periimplantite

A periimplantite é definida como uma reação inflamatória com consequente perda de suporte ósseo ao redor do implante dentário (21). Em comparação com os tecidos periodontais, os tecidos periimplantares têm uma capacidade limitada para resolver lesões associadas ao acúmulo de placa progressivo. Se esta patologia for diagnosticada e caso não se consiga resolver de forma eficaz, a doença periimplantar pode resultar na perda do implante dentário (23).

Sinais e diagnóstico

Os implantes que sofrem de doenças periimplantares são geralmente caracterizados por:

- Ausência de mobilidade do implante (por a porção apical permanecer osteointegrada);

- Bolsas periodontais com profundidades iguais ou superiores a 5 mm;
- Evidência radiográfica de destruição óssea vertical, com o defeito ósseo normalmente em forma de taça em redor do implante;
- Hemorragia à sondagem;
- Possível supuração associada;
- Possível presença de hiperplasia;
- Presença de dor associada não é comum.
- Sinais clínicos de inflamação;
- Sinais de infeção;
- Ulceração do epitélio juncional (21, 24).

Atualmente, o diagnóstico de doenças periimplantares é determinado exclusivamente pela avaliação de parâmetros clínicos utilizados para a apreciação do estado de um implante, uma vez que ainda existe escassez de informação essencial em relação aos mecanismos envolvidos nestas patologias, não havendo ainda um método que avalie o enquadramento molecular que caracterize as doenças periimplantares (25-27).

Constituem atualmente parâmetros de avaliação:

- Avaliação da hemorragia à sondagem;
- Avaliação da higiene oral;
- Exame radiográfico;
- Mobilidade;
- Nível de inserção clínico;
- Sondagem periimplantar;
- Supuração periimplantar (21).

Após a avaliação destes parâmetros é possível estabelecer um diagnóstico que caracterize a saúde periimplantar (21).

Fatores de risco

A identificação dos fatores de risco para o desenvolvimento da periimplantite é muito importante para a implementação da prevenção primária.

Higiene Oral

As bactérias potencialmente periodontopatogénicas colonizam os implantes nas primeiras semanas após a sua inserção e é reconhecido que a acumulação de placa bacteriana induz uma resposta inflamatória caracterizada por sinais de inflamação, tais como: edema, cor vermelha e hemorragia à sondagem. A higiene oral possui um impacto significativo sobre a estabilidade do osso ao redor dos implantes osteointegrados e mesmo em pacientes desdentados, uma má higiene oral relaciona-se com um aumento da perda óssea (28).

História de periodontite

A evidência relativamente a este fator sobre o risco de desenvolver patologia periimplantar advém de estudos transversais clínicos que identificaram a história de periodontite como um indicador de risco para a ocorrência de patologia periimplantar (29-32).

Tabaco

O consumo de tabaco constitui um dos fatores mais discutidos no que respeita ao seu efeito adverso sobre a reabilitação com implantes (23).

Relativamente ao efeito sobre os tecidos periodontais, o consumo de tabaco age ao nível das defesas do hospedeiro, da destruição da matriz extracelular, do aumento da perda óssea e do comprometimento da capacidade de regeneração. Assim o consumo de tabaco está associado ao aumento da probabilidade de ocorrência de doença periodontal, e por analogia, de patologia periimplantar (33).

De facto, relativamente à patologia periimplantar, diversos estudos de revisão identificaram o consumo de tabaco como fator de risco para a ocorrência de periimplantite (22, 28, 29, 33, 34).

Diabetes Melitos

A diabetes é uma doença metabólica multifatorial caracterizada por um estado de hiperglicemia crónico. A grande variedade de mecanismos em que esta está envolvida, pode por sua vez levar a um aumento da suscetibilidade do paciente à infeção ou perda do implante (29).

Ferreira e seus colaboradores (2000) revelaram que uma má monitorização a nível metabólico da diabetes melitos por parte dos indivíduos portadores desta patologia encontra-se relacionada com o desenvolvimento de periimplantite (35).

Localização dos implantes

As características do osso no local de implantação e a localização anatómica estão entre os fatores que parecem influenciar profundamente as taxas de falhas, com taxas de sobrevivência mais baixas a serem geralmente registadas na maxila, podendo este facto ser explicado principalmente pelos diferentes tipos de qualidade óssea e condições de carga dos implantes nestas áreas (36).

Adicionalmente, os implantes colocados em zonas posteriores suportam cargas oclusais superiores, colocando-os em risco aumentado para a incidência de complicações (37, 38).

Num estudo retrospectivo comparativo levado a cabo por Haas e colaboradores (1996) foi observado que a incidência de periimplantite era mais elevada no grupo de fumadores, com uma incidência superior significativa na maxila em relação à mandíbula (39).

A proximidade do implante a outros dentes e implantes também é definido como possível fator de risco para desenvolver periimplantite, por intermédio da hipótese da possível translocação de bactérias entre implantes ou de dentes para implantes (28).

Remodelação óssea

O osso é um tecido especializado com estrutura complexa que permite executar várias funções mecânicas e metabólicas, encontrando-se em constante estado de remodelação de forma a manter estas funções no corpo. Este processo é possível devido à constante desmineralização e reabsorção por parte dos osteoclastos e deposição de novo osso por parte dos osteoblastos, mantendo assim a massa óssea apropriada para o stress exercido sobre o

esqueleto (11). Qualquer alteração neste processo pode alterar a densidade mineralizada, resistência ou microarquitetura óssea. Em condições normais, a osteoclastogênese e remodelação óssea ocorrem dentro da cavidade medular. Estudos revelaram que os osteoclastos são células essenciais para a reabsorção óssea localizada (40).

Os osteoclastos são células multinucleadas, com um papel crucial na reabsorção óssea, como já referido anteriormente. A formação de osteoclastos requer a presença de osteoblastos ou de células estaminais. Estas células expressam o fator de diferenciação osteoclástico, também conhecido como ligando do recetor ativador do fator nuclear-KB [RANK] (RANKL). As células precursoras dos osteoclastos que expressam RANK (recetor de RANKL) reconhecem RANKL dos osteoblastos através de uma interação célula-célula com osteoblastos, promovendo assim a sua diferenciação em osteoclastos. A OPG, que também é secretada pelas células de linhagem osteoblástica, é um recetor solúvel que neutraliza a atividade biológica do RANKL (41). A regulação da expressão de RANK-RANKL por agentes osteoclastogénicos sugerem que os efeitos causados por estes fatores na reabsorção óssea podem ser mediados pelo controlo da produção de RANKL e/ou de OPG e que a formação osteoclástica é determinada principalmente pelo rácio de RANKL/OPG (42). A integridade do tecido ósseo depende de um balanço positivo entre regeneração e reabsorção óssea. Vários estudos têm demonstrado a presença de proteínas em periimplantite que vão interagir ao nível da produção de osteoblastos e osteoclastos, modelando os mecanismos de remodelação óssea (43).

MICROBIOMA DA PERIIMPLANTITE

A cavidade oral encontra-se altamente colonizada por microrganismos, nomeadamente vírus, protozoários, fungos, *archaea* e bactérias, com comunidades bacterianas altamente complexas (44).

A cavidade oral inclui vários *habitats* microbianos como sejam os dentes, o sulco gengival/bolsa periodontal, gengiva aderida, língua, bochecha, lábio, palato duro e palato mole. Contiguamente à cavidade oral estão as tonsilas, faringe, esófago, tubo de Eustáquio, ouvido médio, traqueia, pulmões, sinos e cavidades nasais. O microbioma oral humano é definido como o conjunto de todos os microrganismos que podem ser encontrados na cavidade oral humana e nas extensões contíguas (terminam no esófago distal) (45).

A cavidade oral é um grande ponto de entrada de todo o corpo humano. Através da ingestão de alimentos e da respiração os microrganismos que colonizam uma determinada área da cavidade oral têm uma maior probabilidade de o realizarem e de se disseminarem sucessivamente por áreas contíguas à cavidade oral (45).

Em contraste com o microbiota comensal encontrado em outros locais do corpo humano, que vivem tipicamente em harmonia com o hospedeiro, o microbiota normal da boca é responsável pelas duas doenças mais comuns do homem: a cárie e a doença periodontal. A simples presença de um microbiota oral, presente em quase todas as superfícies da cavidade oral, inibe a colonização por patogénicos, fenómeno designado por resistência à colonização. A importância deste efeito pode ser verificada, uma vez que a disrupção do microbiota comensal pela ação de, por exemplo, agentes antimicrobianos, permite o aparecimento de infeções oportunistas, por exemplo, por espécies de *Candida* e *Staphylococcus aureus* (44).

Após a exposição da superfície do implante com a cavidade oral, o biofilme correspondente é formado. Este produz um interface entre a superfície do implante e os microrganismos iniciais, tais como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sanguis*. Estas bactérias criam uma série de condições prévias para a adesão de agentes patogénicos periodontais, sendo capaz de induzir o desenvolvimento de periimplantite. Existem estudos que apontam para a existência de uma flora alterada nos pacientes com periimplantite, sendo que o papel exato destes microrganismos ainda não foi determinado (46).

PROTEOMA NA PERIIMPLANTITE

Sendo a implantologia uma prática clínica corrente e crescente e, conseqüentemente, a periimplantite uma doença cada vez mais comum e recorrente nos consultórios de medicina dentária, tornou-se necessário desenvolver estudos que permitissem esclarecer os mecanismos moleculares que suportam a fisiopatologia da periimplantite. Neste âmbito, os estudos de proteômica poderão contribuir para o esclarecimento dos mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento da patologia (47).

O proteoma de uma célula, tecido, órgão ou organismo reflete o conjunto de proteínas expressas por este organismo em determinada situação, não sendo estático e podendo modificar-se dependendo das condições a que está exposto. A análise proteômica permite definir as proteínas envolvidas em mecanismos metabólicos relacionados com os diferentes processos celulares, identificar novos alvos farmacológicos e marcadores biológicos relacionados com o processo de estabelecimento e progressão de doenças, levando ao desenvolvimento de novos fármacos e permitindo ainda a caracterização das respostas celulares a determinadas drogas, doenças e mudanças ambientais. Os estudos de proteômica permitem a comparação do proteoma em situações normais ou em doença, o que facilita a identificação de proteínas com expressão alterada, constituindo assim uma possível causa para o comprometimento funcional (47).

Nos últimos anos foram publicados alguns estudos experimentais que forneceram dados de proteômica de pacientes com periimplantite (48). Contudo, estes dados não se encontram organizados de uma forma integrada, estão dispersos por diversas publicações, tornando difícil a sua compilação e interpretação, de forma a poder estabelecer relações e tirar conclusões à luz das evidências científicas.

Para colmatar esta falha foi desenvolvida a ferramenta informática OralCard, que permite reunir as informações consideradas essenciais relativamente às proteínas orais identificadas em várias bases de dados biomédicas e em estudos de proteômica salivar. Além disso, esta ferramenta encontra-se em constante atualização, permitindo analisar a informação obtida, pois agrupa dados referentes à proteína, organiza e relaciona as informações biológicas, facilitando assim a interpretação da informação e o esclarecimento de mecanismos moleculares e fisiopatológicos (48, 49). Aquando da realização deste trabalho, esta ferramenta bioinformática não possuía informações relativas a proteínas consideradas alteradas na periimplantite, podendo estas estarem sobre ou sub expressas.

O INTERACTOMA ORAL HUMANO-MICROBIANO

A cavidade oral é um ecossistema complexo onde os compostos químicos humanos coexistem com uma microflora particular. Contudo, existem mudanças na composição normal desta microflora que podem conduzir ao aparecimento de doenças orais, como por exemplo a periodontite e a cárie dentária (50).

A colonização microbiana da cavidade oral é mediada por interações proteína-proteína (PPIs) entre o hospedeiro e os microrganismos. (50)

Praticamente, todos os eventos celulares, tais como a transdução de sinal, transporte intracelular, replicação de ADN, transcrição, tradução, *splicing*, secreção, controlo do ciclo celular e intermediários metabólicos são mediados por interações Proteína-proteína (PPIs). No sistema patógeno-hospedeiro as PPIs são essenciais para estabelecer a infeção, logo, o conhecimento sobre estas poderá contribuir para elucidar o papel da flora no desenvolvimento de periimplantite (50).

O OralInt é um modelo computacional que prevê PPIs inter-espécies na cavidade oral do ser humano, em particular num ambiente propenso à colonização bacteriana (50).

O resultado dos dados de proteómica inseridos no modelo do OralInt é elaborado segundo os níveis de confiança das PPIs. A previsibilidade deste modelo advém do facto de os domínios da ligação das proteínas revelarem elevada afinidade estrutural e físico-química, com um grau de conservação associado e ainda pelas evidências de que os seus homólogos proteicos interagem frequentemente do mesmo modo (50).

GLICÓMICA

A glicosilação de proteínas é a PTM (modificação pós-traducional) mais comum, sendo essencial para determinar a actividade e função da proteína. Estima-se que mais de 50% das proteínas em mamíferos, sejam glicosiladas. Assim, não é surpreendente verificar que as glicoproteínas estejam envolvidas na regulação da maioria dos processos intra e intercelulares. Este processo é também considerado o mais complexo devido ao elevado número de etapas enzimáticas envolvidas (51, 52).

A glicosilação é reconhecida como um elemento importante na fisiopatologia na doença, levando inúmeros investigadores e organizações a procurar traduzir perfis de glicosilação em biomarcadores de diagnóstico (51).

Existem dois tipos de glicosilação, a glicosilação enzimática de proteínas e a glicosilação não enzimática de proteínas (52).

A glicosilação enzimática de proteínas é realizada por glicosiltransferases, enzimas responsáveis pela transferência de mono ou oligossacarídeos de moléculas dadoras para cadeias crescentes de oligossacarídeos em proteínas. As glicosidases são enzimas que removem grupos de açúcares das proteínas (53). Tanto as glicosiltransferases como as glicosidases são altamente específicas, uma vez que a adição e remoção é realizada em grupos precisos (54). Muitos estudos indicam a importância das glicosiltransferases numa variedade de eventos durante o desenvolvimento e diferenciação celular, bem como em situações de doença (55).

O *folding* de glicoproteínas é regulado pela glicosilação. Os motivos de açúcar podem funcionar como ligandos para recetores de membrana, mediando a ligação celular ou estimulando vias de sinalização. Assim, os oligossacarídeos podem afetar as interações proteína-proteína (55).

Por sua vez, a glicosilação não enzimática de proteínas é um processo no qual as proteínas reagem como moléculas redutoras de açúcares para formar AGEs (*Advanced Glycation end-products*) (54). Este processo é caracterizado pela reação não enzimática entre os grupos de amina e os grupos carbonyl de açúcares redutores, também conhecida como reação de *Maillard* (56).

A ocorrência deste tipo de glicosilação está dependente da concentração e presença de agentes glicosidantes, nomeadamente a glicose ou os seus metabolitos, como a frutose (56).

Os AGEs acumulam-se nos tecidos, resultado da sua formação ao longo da vida, encontrando-se com níveis significativamente superiores em idosos. Estes têm sido associados ao desenvolvimento de muitas doenças, como a nefropatia, doença periodontal, osteoartrite e disfunção do miocárdio. Por outro lado, em pacientes com determinadas patologias, como a diabetes melitos, o aumento da glicosilação pode conduzir a uma formação acelerada de AGEs (57).

Os produtos da glicosilação não enzimática, têm sido associados à inibição da remodelação óssea, tendo implicações diretas na ligação osso-implante (57).

Assim, justifica-se que nos últimos anos se tenha adotado o conceito Glicómica, um importante domínio emergente das Ciências Ómicas (52).

OBJETIVOS

Dada a crescente prática clínica no âmbito da implantologia dentária, é verificado de forma cada vez mais comum nos consultórios de medicina dentária, a presença de periimplantite. Surge assim a necessidade de elucidar os mecanismos moleculares implicados em periimplantite, até agora praticamente ignotos.

Até ao presente, as correlações entre síndromes e análises patológicas têm sido a abordagem mais comum e aceite perante a comunidade médica e a sociedade em geral, contudo esta apresenta graves falhas perante a realidade mais exigente da medicina molecular moderna. Falhas estas que estão sobretudo relacionadas com a sua dependência em princípios reducionistas de experimentação e análise de componentes individuais. Assim, com este estudo pretende-se gerar dados biológicos relevantes, que contribuam para o esclarecimento dos mecanismos moleculares das doenças periimplantares, com particular ênfase na periimplantite.

Desta forma, os objetivos desta dissertação são:

- Catalogar todas as proteínas humanas da cavidade oral de pacientes com periimplantite, anotando manualmente informações relevantes para a interpretação dos dados;
- Atualizar a base de dados do proteoma salivar, OralOma, com a informação produzida, a qual pode ser consultada via internet recorrendo à ferramenta OralCard;
- Caracterizar o proteoma salivar da periimplantite, avaliando as implicações funcionais das proteínas humanas presentes neste;
- Identificar o Glico-OralOma da periimplantite;
- Identificar os géneros de microrganismos aumentados em periimplantite face ao paciente saudável;
- Identificar as glicosidades e glicosil-transferases nos géneros de microrganismos presentes de forma diferenciada em periimplantite face ao paciente saudável;
- Identificar quais as enzimas com atividade glicosídica produzidas pelos microrganismos que podem interagir com proteínas humanas glicosiladas identificadas como alteradas na periimplantite.

Face aos objetivos traçados para esta dissertação serão identificadas quais as proteínas que em periimplantite apresentam expressão alterada e destas, quais as glicoproteínas que podem ser alteradas por ação de enzimas modificadoras de açúcares de origem microbiana. A

identificação das proteínas alteradas e das glicoproteínas cuja atividade pode ser modificada, permitirá identificar não só quais os processos moleculares que se encontram comprometidos nesta patologia, mas também permitirá esclarecer o contributo da flora que está presente de forma diferenciada em situações de periimplantite.

MATERIAIS E MÉTODOS

ORALOMA HUMANO DA PERIIMPLANTITE

As proteínas presentes e alteradas

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica com recurso à ferramenta de pesquisa avançada do portal PubMed, usando como palavras-chave os termos MeSH: “Periimplantitis and proteom*”, “Periimplantitis and protein*”, “Implant bone loss and protein”, “Dental implant and bone loss”.

Foram utilizados os filtros de pesquisa “*Humans*” e “*Publication dates*”, sendo estes filtros responsáveis por incluir, exclusivamente, artigos com resultados experimentais referentes à espécie *Homo Sapiens* e data de publicação, respetivamente, sendo que para o filtro “*Publication dates*” foi utilizado um intervalo de tempo de vinte anos (01/01/1992 e 01/02/2013). A seleção de artigos a analisar incluiu os resultados onde foram identificadas proteínas alteradas em periimplantite, sendo excluídos os artigos que não fossem referentes a periimplantite e artigos referentes a perda de implantes, não por periimplantite.

Com base nos artigos recolhidos foi realizado um levantamento de todas as proteínas alteradas em pacientes com periimplantite e a informação foi depositada na base de dados do proteoma salivar – OralOma, a qual pode ser consultada via internet, recorrendo à ferramenta Oralcard.

Anotação manual dos dados relativos às proteínas presentes e alteradas em

Periimplantite

Foi realizada uma anotação manual dos dados relativos às proteínas da periimplantite, fruto da análise de cada um dos estudos. Os dados recolhidos foram organizados numa tabela que inclui diversas características das proteínas, assim como do estudo que as identificou (Figura 1).

Para efetuar esta anotação foi utilizado o software Microsoft Excel 2013.

| | | | | | | | |
|---------------|---------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------|------------|--------------------|------------------|
| UniProtKB AC | Name | Parotid | Parotid Exosome | SMISL | Minor | Whole Saliva | Crevicular Fluid |
| Mucosa | Tongue | Health | Disease (OMIM) Diseases Database | Disease (MeSH ID) | Regulation | Age group | Gender |
| Social Habits | Methods of Sampling | Methods of Analysis | Type of Study | PFM | Biomarker | Citation (NCBI ID) | Obs |

Figura 1 - Cabeçalhos que permitem a organização da informação recolhida dos diferentes estudos de proteómica da cavidade oral (proteínas identificadas na periimplantite anotadas manualmente) numa tabela em Microsoft Excel 2013.

Segue-se à apresentação dos campos utilizados para a construção da informação sobre as proteínas em periimplantite.

Identificação da proteína

Os dois campos visíveis na Figura 2 fornecem informações em relação à identificação da proteína, como o seu código Uniprot KB AC e o seu respetivo nome.

| | |
|--------------|------|
| UniProtKB AC | Name |
|--------------|------|

Figura 2 - Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2013 relativa à origem identificação das proteínas da periimplantite anotadas manualmente.

Proveniência da amostra

Como demonstrado na Figura 3, as possíveis proveniências das proteínas orais anotadas da periimplantite são as glândulas parótidas, o exossoma da glândula parótida, glândulas submandibulares e sublinguais, glândulas minor, saliva total, fluído crevicular, mucosa oral e língua.

| | | | | | | | |
|---------|-----------------|-------|-------|--------------|------------------|--------|--------|
| Parotid | Parotid Exosome | SMISL | Minor | Whole Saliva | Crevicular Fluid | Mucosa | Tongue |
|---------|-----------------|-------|-------|--------------|------------------|--------|--------|

Figura 3 - Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2013 relativa à origem das proteínas da periimplantite anotadas manualmente.

Com recurso a uma ferramenta especializada no cálculo e desenho de diagramas de Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>), foi possível realizar uma análise dos dados relativos à proveniência das proteínas, descritas na Figura 4. Esta ferramenta permite calcular as interseções de diversas listas de elementos (tendo um máximo de 30

listas), obtendo-se um resultado textual que permite identificar que elementos estão em cada uma das interseções ou se são únicos numa determinada lista.

The screenshot shows the 'INPUT section' of a Venn Diagram tool. It has three sections: 'upload files', 'upload lists', and 'Add Another File'. Under 'upload files', there are three rows, each with a file selection button ('Escolher ficheiro'), a status ('Nenhum ficheiro selecionado'), and a 'Remove' button. Under 'upload lists', there are three lists: 'list 1' with IDs P18510, P01583, P01584; 'list 2' with IDs P05204, P10147, P02458; and 'list 3' with IDs Q00300, P01375, Q9NPA2. Each list has an 'Empty' button. At the bottom, there are 'Submit' and 'Reset' buttons.

Figura 4 - Interface da ferramenta Diagrama de Venn após a inserção dos dados das três listas a intersecar.

Relação com estado de saúde e doença

A recolha desta informação permite concluir se a proteína está presente no estado de saúde, no estado de doença ou em ambos (Figura 5).

| Health | Disease (OMIM ID or Diseases Database) | Disease (MeSH ID) | Regulation |
|--------|--|-------------------|------------|
|--------|--|-------------------|------------|

Figura 5 - Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2013 referente à relação das proteínas anotadas da periimplantite com os estados de saúde e doença.

A regulação determina a quantificação da proteína na doença em relação ao controlo saudável e, deste modo, poderá facilitar a interpretação das alterações moleculares observadas entre os dois estados. De modo a quantificar a sua alteração recorreu-se ao *Fold change calculation*.

$$\text{Fold change calculation} = \left(\frac{\text{número de ocorrências na doença}}{\text{número de ocorrências no controlo}} = \chi \right)$$

Acontecimento a): $\chi \geq 1$, significa que regulação é positiva

Acontecimento b): $0 < \chi < 1$, significa que regulação é negativa

Quando ocorre o acontecimento b) é necessário realizar o quociente para que se obtenha uma regulação com valor negativo.

Quociente = $(\frac{1}{\chi} = Y)$ ao Y é atribuído um valor negativo(-Y).

Assim, quando uma proteína apresenta um *Fold change calculation* de 0,5, significa que esta proteína se encontra diminuída na doença 2 vezes em relação ao estado saudável, sendo anotado o valor -2. Esta representação permite identificar de forma mais intuitiva a variação negativa da quantidade/atividade de uma proteína num estado de doença relativamente ao estado saudável.

Caracterização dos indivíduos da amostra

Segundo é possível observar na Figura 6, a caracterização dos indivíduos da amostra obtém-se a partir da sua faixa etária, género e hábitos sociais. É importante a anotação destes dados uma vez estes fatores podem ser modificadores da expressão das proteínas em grupos com características distintas.



Figura 6 - Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2013 referente à caracterização do indivíduo dador da amostra.

Métodos de recolha e análise da amostra

Os métodos utilizados para a recolha da amostra e análise foram anotados de forma a permitir caracterizar as metodologias utilizadas na recolha, identificação e na análise das proteínas (Figura 7).

| | |
|------------------------------|-------------------------------|
| Methods of Sampling** | Methods of Analysis*** |
|------------------------------|-------------------------------|

Figura 7 - Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2013 referente aos métodos de recolha e análise das proteínas da periimplantite.

Outras Informações

Foram anotadas informações relativamente à presença de modificações pós-tradução nas proteínas identificadas e se estas foram propostas pelo autor como biomarcador no estudo em questão (Figura 8).

| | |
|------------|------------------|
| PTM | Biomarker |
|------------|------------------|

Figura 8 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2013 referente às características especiais das proteínas da periimplantite.

Caracterização do estudo

Foi anotado o tipo de estudo e o NCBI ID (código do PubMed (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) referente ao estudo) referente ao mesmo (Figura 9).

| | |
|----------------------|---------------------------|
| Type of Study | Citation (NCBI ID) |
|----------------------|---------------------------|

Figura 9 - Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2013 relativa à informação dos estudos que permitiram a recolha das proteínas da periimplantite anotadas manualmente.

Caracterização do proteoma da Periimplantite

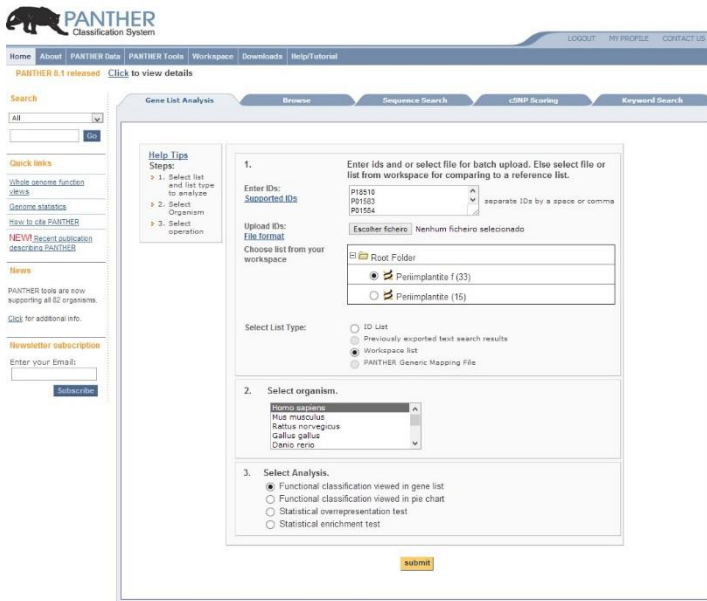
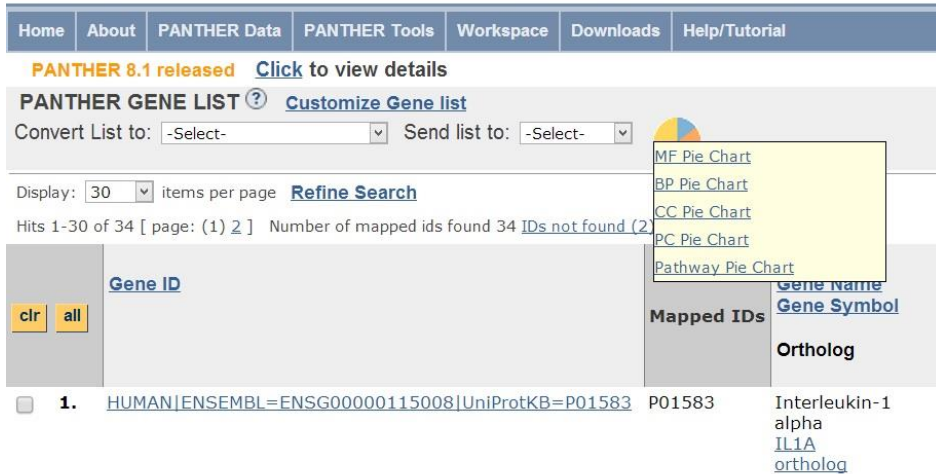


Figura 10 - Interface do sistema de análise em grupo da ferramenta de classificação do PANTHER. As opções selecionadas correspondem às definições utilizadas para analisar os conjuntos de proteínas anotados na periimplantite.

Através da utilização da ferramenta PANTHER – Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships – (<http://panther.org>) (58) realizou-se a classificação funcional das proteínas da periimplantite de acordo com a sua ontologia (Figura 10). As ontologias do PANTHER referem-se à organização das proteínas segundo os seus processos biológicos, funções moleculares, vias de sinalização, classe proteica e componentes celulares. A ferramenta

PANTHER classifica genes e proteínas segundo as suas funções (59). Para tal, utiliza evidências científicas experimentais publicadas e relações evolutivas inferidas por revisores especializados, com o objetivo de prever funções mesmo na ausência de evidências experimentais diretas. Deste modo, as proteínas foram classificadas segundo a função molecular que desempenham, o processo biológico em que intervêm e as vias de sinalização em que estão envolvidas.

Para a realização desta caracterização faz-se o *input* de dados no PANTHER com o respetivo código UniProtKB das proteínas anotadas de periimplantite. Após essa inserção de dados, seleciona-se a espécie humana e o tipo de análise desejado, neste caso será “*Functional classification viewed in gene list*”. Após a submissão dos dados obtém-se uma tabela com uma série de informações referentes às proteínas inseridas. Nesta interface é possível selecionar o tipo de classificação desejado (Figura 11), sendo que *MF Pie Chart* fornece a classificação segundo a função molecular, *BP Pie Chart* a classificação segundo os processos biológicos, *CC Pie Chart* a classificação segundo os componentes celulares, *PC Pie Chart* a classificação segundo a classe proteica e a *Pathway Pie Chart* a classificação segundo as vias de sinalização.



The screenshot shows the PANTHER web interface. At the top, there is a navigation bar with links: Home, About, PANTHER Data, PANTHER Tools, Workspace, Downloads, and Help/Tutorial. Below this, a banner indicates 'PANTHER 8.1 released' with a link to view details. The main section is titled 'PANTHER GENE LIST' and includes a 'Customize Gene list' link. There are dropdown menus for 'Convert List to:' and 'Send list to:'. A 'Display:' dropdown is set to '30' items per page, and a 'Refine Search' link is present. The search results show 'Hits 1-30 of 34' and 'Number of mapped ids found 34'. A table of results is displayed with columns for 'Gene ID', 'Mapped IDs', 'Gene Name', 'Gene Symbol', and 'Ortholog'. The first result is for 'Interleukin-1 alpha' (IL1A). A dropdown menu is open over the 'Mapped IDs' column, showing options: 'MF Pie Chart', 'BP Pie Chart', 'CC Pie Chart', 'PC Pie Chart', and 'Pathway Pie Chart'.

Figura 11 - Seleção do tipo de classificação desejado, interface da ferramenta PANTHER.

Embora estejam disponíveis cinco tipos de classificações, apenas foram utilizadas a *MF Pie Chart*, *BP Pie Chart* e *Pathway Pie Chart*.

Comparação com o OralOma normal

Depois da recolha e análise dos dados referentes às três ontologias (função molecular, processos biológicos e vias de sinalização) das proteínas de periimplantite, foi realizada uma comparação de cada ontologia com uma lista de referência, lista essa que apresenta todas as proteínas identificadas em pacientes saudáveis, apenas não apresentando as proteínas que foram identificadas exclusivamente na doença. Esta lista é designada por OralOma normal de um individuo e foi recolhida a partir da base de dados do OralCard (<http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/>) (48, 49).

O objetivo desta comparação foi determinar, com um intervalo de confiança específico, os valores obtidos com os valores esperados, permitindo desse modo perceber se as diferentes ontologias das proteínas de periimplantite se encontravam acima ou abaixo dos valores esperados comparativamente ao OralOma normal.

Realizou-se o cálculo da diferença fracional para quantificar a diferença entre os valores observados e os valores esperados de cada item. A diferença fracional pode ser definida pela fórmula seguinte:

$$DF = \frac{(\chi^1 - \chi^2)}{(\chi^2)}$$

DF – Diferença Fracional

χ^1 - Corresponde ao valor observado

χ^2 – Corresponde ao valor esperado

Após o cálculo da diferença fracional recorreu-se à aplicação de um teste binomial descrito por Cho e Champbell TIGS em 2000 (60), de forma a obter a significância estatística expressa segundo um nível descritivo, o *p-value*. Quanto menor o *p-value* menor será a probabilidade do resultado observado ser devido à aleatoriedade, ou seja, um resultado é tanto mais significativo quanto menor for o seu *p-value*.

Identificação de potenciais interações proteína-proteína

Após a recolha e organização das informações relativas às proteínas de periimplantite, foi necessário estabelecer a rede de interactómica formada entre estas proteínas.

O objetivo da interactómica é determinar e interpretar a rede formada, permitindo inferir relações funcionais entre as proteínas identificadas em periimplantite. Deste modo, foi usada a ferramenta bioinformática STRING (61) que é uma base de dados de interações proteína-proteína conhecidas ou previstas. Para a previsão e construção das redes de interação proteína-proteína (PPI), o STRING baseia-se em dados experimentais diretos, dados de genómica, previsões baseadas em modelos computacionais e bibliografia disponível publicamente. A última versão desta ferramenta bioinformática contém informação relativa a 5214234 proteínas de 1133 organismos.

Utilizando a ferramenta STRING:

- 1- Insere-se no separador “*Multiple Names*” os códigos UniProt KB das proteínas em estudo, neste caso as identificadas em periimplantite. Após a sua introdução clica-se em “GO !” (Figura 12)

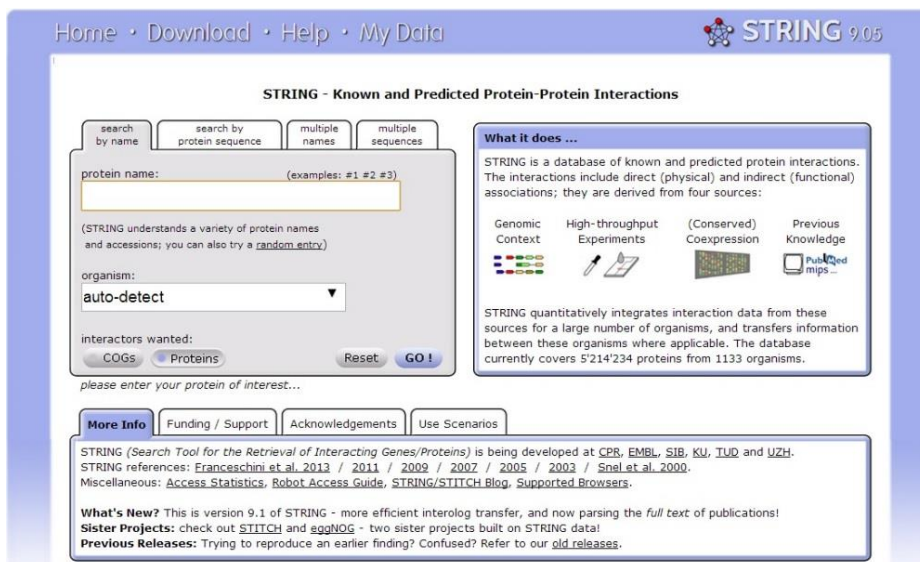


Figura 12 – Página inicial e de input da ferramenta STRING.

- 2- Surge uma lista de todas as proteínas a integrar a rede de interactómica. Para evitar dúvidas, devem ser sempre colocados os códigos UniProt KB em vez do nome da proteína.(Figura 13).



Figura 13 – Página de seleção e confirmação das proteínas inseridas, ferramenta STRING.

- 3- Rede de interactómica gerada no STRING (Figura 14)

Nas redes de PPIs geradas no STRING as linhas que unem as proteínas podem ser descritas e alteradas de acordo com alguns parâmetros, como o grau de confiança relativo à evidência existente, tipo de evidência e ação já conhecida desempenhada pelas proteínas envolvidas na PPI.

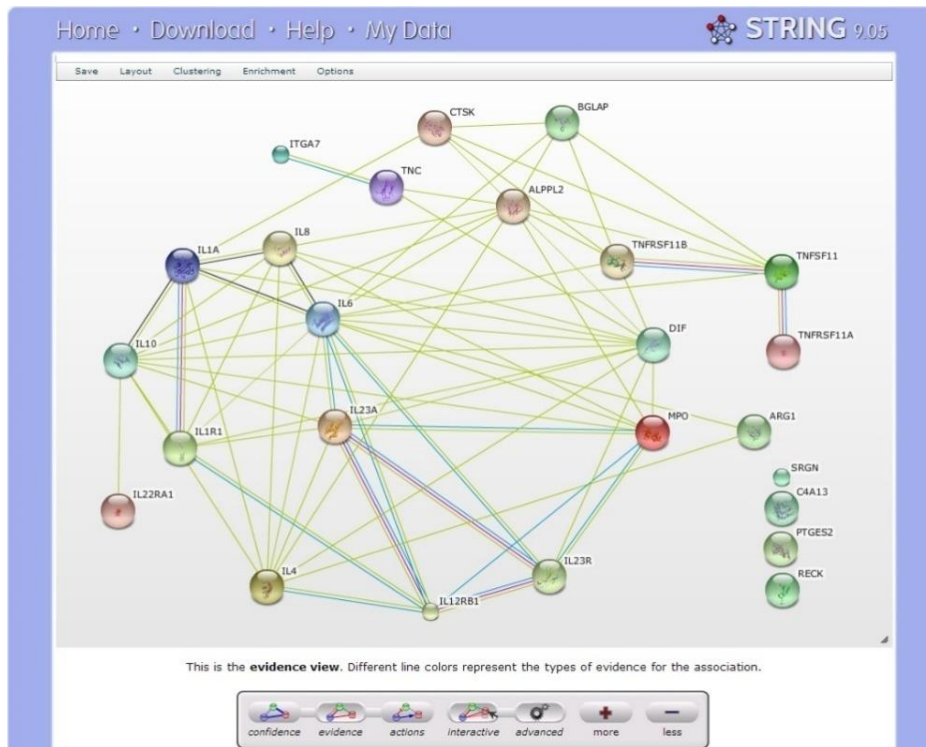


Figura 14 – Rede de interactiva gerada pelo STRING, as diferentes cores das linhas representam a fonte de informação.

A Figura 15 mostra o significado das linhas que unem as proteínas.



Figura 15 – Relação das cores que unem as proteínas na rede interactiva gerada pelo STRING com a sua fonte de informação.

Existe um conjunto de funcionalidades disponíveis no STRING que permite a interpretação dos dados de interactiva. O STRING torna possível agrupar as proteínas de acordo com ontologias, sendo essas as funções moleculares, os processos biológicos, o componente celular e as vias de sinalização. Também é possível agrupar as proteínas de acordo com o seu STRING *global score*, ou seja, determinar as interações entre proteínas consoante o seu grau de fiabilidade.

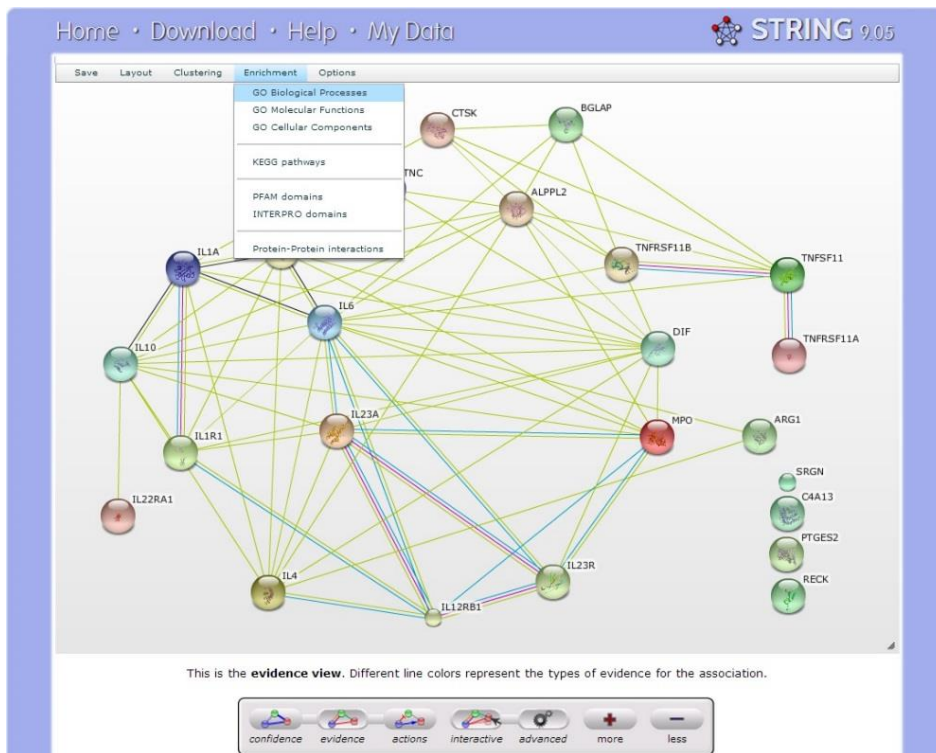


Figura 16 - Seleção do tipo de ontologia desejado, interface da ferramenta STRING.

Glico-OralOma

De modo a estabelecer o Glico-OralOma da periimplantite registaram-se as proteínas cujos estudos referiam a existência de PTMs.

Nas proteínas em que não foram anotadas PTMs, recorreu-se à base de dados UniProt, no sentido de apurar se as mesmas apresentavam PTMs quando identificadas noutros tecidos, que não da cavidade oral.

MICROBIOMA ORAL DE PERIIMPLANTITE

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica com recurso à ferramenta de pesquisa avançada do portal PubMed, usando com palavras-chave os termos MeSH: “Periimplantitis and microbiota*”, “Periimplantitis and microorganism*”, “Periimplantitis and bacteria”.

Foram utilizados os filtros de pesquisa “*Humans*” e “*Publication dates*”, sendo estes filtros responsáveis pela escolha exclusiva de artigos com resultados experimentais referentes à espécie *Homo Sapiens* e data de publicação respetivamente. Para o filtro “*Publication dates*” foi utilizado um intervalo de tempo de vinte anos (01/01/1992 e 01/02/2013). A seleção de artigos a analisar incluiu os resultados onde foram identificados microrganismos alterados em periimplantite, sendo excluídos os artigos que não fossem referentes à periimplantite.

Com base nos artigos recolhidos foi realizado um levantamento de todos os géneros de microrganismos presentes e aumentados em periimplantite, tendo por base a comparação da flora em pacientes saudáveis. Também foram anotadas algumas informações consideradas importantes para a interpretação dos dados.

Informações recolhidas

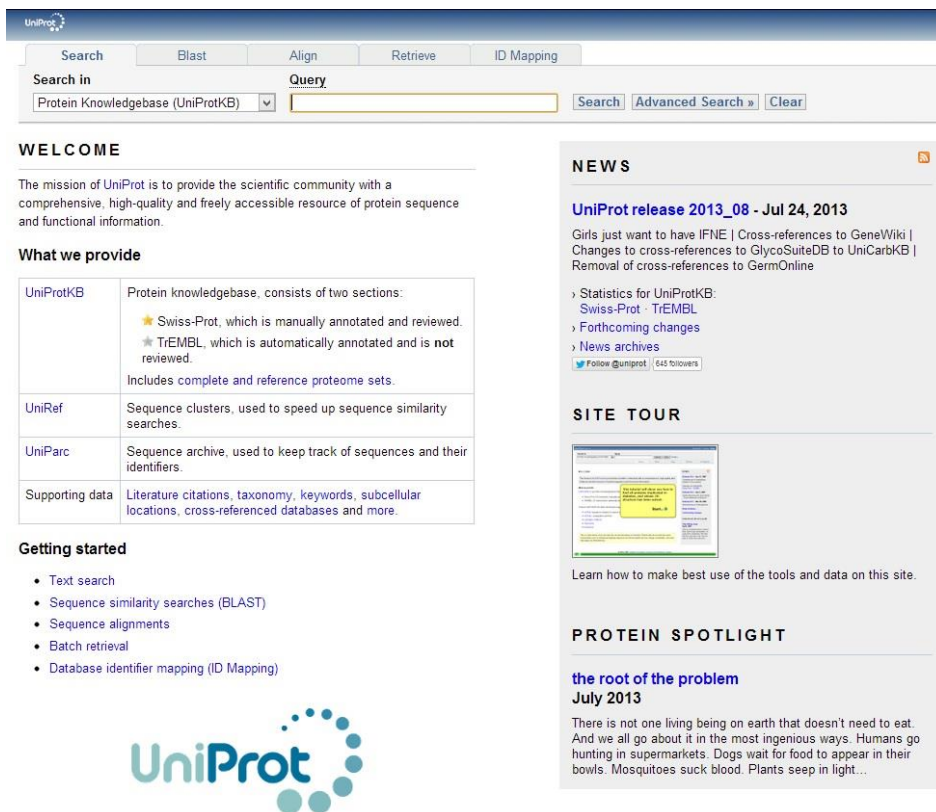
Tal como realizado anteriormente para a caracterização do proteoma da periimplantite, foram anotadas as informações consideradas essenciais para a interpretação dos dados relativos ao microbioma da periimplantite. Estes dados de identificação incluem a informação sobre o género dos microrganismos, o local de obtenção da amostra, a sua relação com o estado de saúde e de doença, a regulação, a caracterização do dador da amostra, a caracterização dos métodos de amostragem e análise, e informações relativas ao estudo de onde estes foram retirados. (Figura 17)

| NCBI Taxon ID | Organism Name | Domain | All Body Subsites | Health | Disease (OMIM ID or Diseases Database) | Disease (MeSH ID) | Regulation |
|---------------|---------------|----------------|--------------------|-----------------------|--|-------------------|--------------------|
| Age group | Gender* | Social Habits* | Exclusion Criteria | Methods of Sampling** | Methods of Analysis*** | Type of Study | Citation (NCBI ID) |

Figura 17 - Cabeçalhos que permitem a organização da informação recolhida dos diferentes estudos de microbiologia da cavidade oral (microrganismos identificadas na periimplantite anotadas manualmente) numa tabela em Microsoft Excel 2013.

As proteínas bacterianas produzidas pelo microbioma em Periimplantite

Com o intuito de identificar as proteínas produzidas pelos microrganismos do microbioma de periimplantite, recorreu-se à base de dados do UniProt KB (<http://uniprot.org/>) (62) (Figura 18).



The screenshot shows the UniProtKB homepage. At the top, there are navigation tabs: Search, Blast, Align, Retrieve, and ID Mapping. Below these is a search bar with a dropdown menu set to 'Protein Knowledgebase (UniProtKB)' and a 'Query' input field. To the right of the search bar are buttons for 'Search', 'Advanced Search', and 'Clear'. The main content area is divided into several sections:

- WELCOME**: A paragraph stating the mission of UniProt to provide a comprehensive, high-quality, and freely accessible resource of protein sequence and functional information.
- What we provide**: A table listing various services and data types:

| | |
|-----------------|--|
| UniProtKB | Protein knowledgebase, consists of two sections: <ul style="list-style-type: none">★ Swiss-Prot, which is manually annotated and reviewed.★ TrEMBL, which is automatically annotated and is not reviewed. Includes complete and reference proteome sets. |
| UniRef | Sequence clusters, used to speed up sequence similarity searches. |
| UniParc | Sequence archive, used to keep track of sequences and their identifiers. |
| Supporting data | Literature citations, taxonomy, keywords, subcellular locations, cross-referenced databases and more. |
- Getting started**: A list of links for text search, sequence similarity searches (BLAST), sequence alignments, batch retrieval, and database identifier mapping (ID Mapping).
- NEWS**: A section titled 'UniProt release 2013_08 - Jul 24, 2013' with links to cross-references to GeneWiki, GlycoSuiteDB, UniCarbKB, and GermOnline. It also includes links for statistics, news archives, and a Twitter follow button.
- SITE TOUR**: A section with a small image and a link to learn how to make best use of the tools and data on the site.
- PROTEIN SPOTLIGHT**: A section titled 'the root of the problem' from July 2013, with a short paragraph about the biological importance of the root of the problem.

At the bottom center, the UniProt logo is displayed, consisting of the word 'UniProt' in blue and green, with a circular arrangement of dots to its right.

Figura 18 – Interface da página inicial do UniProtKB.

Esta base de dados possui informação estrutural e funcional relativamente a cada proteína bem como os seus diferentes nomes, estados de revisão, organismos onde foram identificadas, domínios estruturais, alterações tridimensionais, *EC Number*, entre outros.

Foi realizada a recolha da informação relativa às proteínas produzidas por cada microrganismo identificado como estando alterado em periimplantite, recorrendo à ferramenta *advanced search* do UniProtKB (Figura 19). Esta recolha foi realizada de forma individual para cada microrganismo identificado como alterado na periimplantite.

The screenshot shows the UniProtKB advanced search interface. At the top, there are tabs for 'Search', 'Blast', 'Align', 'Retrieve', and 'ID Mapping'. The 'Search' tab is active, showing a search bar with 'streptococcus' and a dropdown menu for 'Protein Knowledgebase (UniProtKB)'. Below the search bar, there are fields for 'Field' (set to 'All') and 'Term' (set to 'Humans'). There are buttons for 'Search', 'Clear', 'Add & Search', and 'Cancel'.

The main content area is divided into several sections:

- WELCOME:** A brief introduction to UniProt's mission.
- What we provide:** A table listing various UniProt services:

| | |
|-----------------|--|
| UniProtKB | Protein knowledgebase, consists of two sections: <ul style="list-style-type: none"> ★ Swiss-Prot, which is manually annotated and reviewed. ★ TrEMBL, which is automatically annotated and is not reviewed. Includes complete and reference proteome sets. |
| UniRef | Sequence clusters, used to speed up sequence similarity searches. |
| UniParc | Sequence archive, used to keep track of sequences and their identifiers. |
| Supporting data | Literature citations, taxonomy, keywords, subcellular locations, cross-referenced databases and more. |
- Getting started:** A list of search options: Text search, Sequence similarity searches (BLAST), Sequence alignments, Batch retrieval, and Database identifier mapping (ID Mapping).
- NEWS:** A section for updates, including 'UniProt release 2013_08 - Jul 24, 2013' and links to statistics and news archives.
- SITE TOUR:** A link to learn how to make best use of the tools and data on the site.
- PROTEIN SPOTLIGHT:** A feature titled 'the root of the problem July 2013' with a short text snippet.

At the bottom of the page is the UniProt logo.

Figura 19 – Interface da página de pesquisa avançada do UniProtKB

Enzimas microbianas com atividade de glicosilação/desglicosilação

Após a recolha no UniProt KB de todas as proteínas produzidas pelos microrganismos identificados como alterados em periimplantite, foram agrupadas todas as que possuem capacidade de glicosilar/desglicosilar outras proteínas.

Para tal, recorreu-se aos dados previamente exportados da base de dados UniProt KB para uma folha de cálculo do *software* Microsoft Excel 2013, com o intuito de criar um filtro de texto na coluna respetiva ao seu *EC Number* – critério de referência no passo seguinte.

O *EC Number* é dado pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB), sendo constituído por um conjunto de quatro algarismos que dão informação quanto ao tipo de reações enzimáticas.

Recorreu-se ainda à base de dados BRENDA (<http://brenda-enzymes.org/>) (63) (Figura 20), que reúne toda a informação estrutural/funcional de enzimas e permite identificar as classes a que pertencem e as respetivas reações catalisadas.

The screenshot shows the BRENDA website interface. At the top, there is a navigation bar with links for 'BRENDA home', 'login', 'history', and 'All enzymes'. The BRENDA logo is prominently displayed on the right. Below the navigation bar, the 'EC Explorer' tool is active, showing a search and browse interface. The main content area displays a hierarchical list of enzyme classes and their sub-classes, along with the number of organisms associated with each. The left sidebar contains navigation options like 'Quick Search', 'Fulltext Search', 'Advanced Search', 'Substructure Search', 'TaxTree Explorer', 'EC Explorer', 'Sequence Search', 'Genome Explorer', 'Ontology Explorer', 'Functional Enzyme Parameters', 'SBML Output', and 'SOAP'. Below this, there are links for 'Tutorial/Training', 'BRENDA input', 'Propose new enzyme', 'Improve BRENDA!', 'Introduction/References', 'Contact and Impressum', 'News', 'Jobs', 'Copyright', 'Related Links', 'Help', 'Acknowledgments', and 'BRENDA on Facebook'. At the bottom of the sidebar, it says 'BRENDA Professional Commercial Version Release 2013.2 (July 2013)'. The main content area shows a tree structure starting with '1 Oxidoreductases (6951 organisms)', '2 Transferases (5035 organisms)', and '3 Hydrolases (8314 organisms)'. Under '3 Hydrolases', there are 13 sub-classes listed, such as '3.1 Acting on ester bonds (3011 organisms)', '3.2 Glycosylases (3300 organisms)', '3.3 Acting on ether bonds (127 organisms)', '3.4 Acting on peptide bonds (peptidases) (1754 organisms)', '3.5 Acting on carbon-nitrogen bonds, other than peptide bonds (1822 organisms)', '3.6 Acting on acid anhydrides (927 organisms)', '3.7 Acting on carbon-carbon bonds (117 organisms)', '3.8 Acting on halide bonds (119 organisms)', '3.9 Acting on phosphorus-nitrogen bonds (3 organisms)', '3.10 Acting on sulfur-nitrogen bonds (7 organisms)', '3.11 Acting on carbon-phosphorus bonds (42 organisms)', '3.12 Acting on sulfur-sulfur bonds (19 organisms)', and '3.13 Acting on carbon-sulfur bonds (16 organisms)'. Below these, there are '4 Lyases (3622 organisms)', '5 Isomerases (1373 organisms)', and '6 Ligases (1149 organisms)'. Each class and sub-class has small icons next to it, likely for filtering or viewing options.

Figura 20 – Interface da página inicial da ferramenta BRENDA

Obtidos os respetivos *EC Numbers*, foi então possível, no passo seguinte, ordená-los de forma a selecionar as enzimas capazes de adicionar ou remover de açúcares.

Os dados filtrados em Excel exibem somente as linhas que atendem aos critérios especificados e oculta as linhas que não deseja exibir. Através da especificação/filtro para as enzimas com *EC Number* começado com “2.4.” e “3.2” (as que participam na adição e remoção de açucares), foi possível recolher e organizar os microrganismos segundo o critério de triagem atrás descrito, ou seja, de acordo com a sua capacidade de promover eventuais alterações em glicoproteínas, por recurso à adição ou remoção de açucares.

INTERACTOMA DO MICROBIOTA E O PROTEOMA HUMANO EM PERIIMPLANTITE

No sentido de esclarecer a eventual ação que as proteínas microbianas podem desencadear nas proteínas humanas no contexto da periimplantite, foi traçado o interactoma humano-bacteriano, recorrendo ao Oralint (<http://bioinformatics.ua.pt/software/oralint/>).

O Oralint é o primeiro modelo computacional capaz de prever as interações proteína-proteína (PPIs) inter-espécies na cavidade oral humana. Este modelo que permite traçar a rede de interactoma humano-microbiano, é baseado na informação funcional e estrutural de 4707 proteínas que foram identificadas em estudos de proteómica como estando presentes na cavidade oral da espécie *Homo Sapiens* e que integram a base de dados do OralCard. Além destas, ainda contém os dados de PPIs determinadas experimentalmente com elevada qualidade provenientes de cinco bases de dados: BIOGRID, DIP, HPRD, IntAct, MINT (50).

A visualização do interactoma humano-microbiano é possível recorrendo à ferramenta Cytoscape, na qual podem ser visualizadas e classificadas as PPIs como “*HUMAN-HUMAN*”, se as proteínas que interagem entre si são apenas de origem humana, “*MICRO-MICRO*”, se as proteínas que interagem entre si são apenas de origem microbiana, ou “*HUMAN-MICRO*”, se a interação é feita entre uma proteína humana e uma microbiana.

O interactoma humano-microbiano foi determinado para cada um dos géneros de microrganismos identificados como aumentados na periimplantite face ao paciente saudável, assumindo-se que todas as espécies de cada género partilham as mesmas características funcionais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ORALOMA HUMANO DA PERIIMPLANTITE

Para gerar dados biológicos relevantes, que possibilitem uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares da periimplantite, é fundamental estabelecer o OralOma humano da periimplantite.

As proteínas presentes e alteradas

Após uma extensa pesquisa e análise de estudos experimentais de proteômica identificaram-se trinta e seis proteínas como estando presentes na cavidade oral em pacientes com periimplantite, definindo-se assim o OralOma humano desta patologia. Foram encontrados e analisados 20 estudos (64-83)

Com os resultados obtidos desta análise foi possível atualizar a base de dados do OralCard com 36 proteínas (e respetiva informação anotada manualmente de acordo com a secção “Material e Métodos - Anotação manual dos dados relativos às proteínas presentes e alteradas em Periimplantite”) referentes à periimplantite (Anexo (Tabela A)). Esta atualização é importante, não apenas por ser o primeiro contributo no que concerne à periimplantite, mas também pelas constantes publicações de novos estudos experimentais de proteômica que possam conter informações de proteínas com perfis de expressão alterados. Assim, torna-se possível obter, numa base de dados, toda a informação sintetizada referente a uma patologia.

A Tabela 1 indica as proteínas orais identificadas na periimplantite, resultado da análise dos estudos experimentais referentes a esta doença.

Tabela 1 - Proteínas identificadas na periimplantite

| UniProtKB AC | Nome | Regulação | Referência |
|-----------------|---|-----------|---------------------------------|
| P18510 | Interleukin-1 receptor antagonist protein | ↑ | Laine NL e colaboradores (2006) |
| P01583 | Interleukin-1 Alpha | ↑ | Laine NL e colaboradores (2006) |
| P01584 | Interleukin-1 Beta | ↑ | Laine NL e colaboradores (2006) |

| | | | |
|---------------|---|-----|------------------------------------|
| P05112 | Interleukin-4 | ↓ | Duarte PM e colaboradores (2009) |
| P05231 | Interleukin-6 | ↑ | Severino e colaboradores (2011) |
| P10145 | Interleukin-8 | ↑ | Severino VO e colaboradores (2011) |
| P22301 | Interleukin-10 | ↑ | Duarte PM e colaboradores (2009) |
| O60595 | Interleukin-12 | ↑ | Duarte PM e colaboradores (2009) |
| Q5QEX9 | Interleukin-17 | ↑ | Severino VO e colaboradores (2011) |
| Q9GZX6 | Interleukin 22 | ↑ | Luo Z. e colaboradores (2013) |
| Q8N6P7 | Interleukin 22 receptor | ↑ | Luo Z. e colaboradores (2013) |
| Q9NPF7 | Interleukin 23 | ↑ | Luo Z. e colaboradores (2013) |
| O14788 | Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11 | ↑ | Duarte PM e colaboradores (2009) |
| O00300 | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B | ↓ | Duarte PM e colaboradores (2009) |
| P01375 | Tumor factor necrosis | ↑ | Duarte PM e colaboradores (2009) |
| O14788 | Tumor Necrosis factor ligand superfamily member 11 | 1,8 | Rakic M. e colaboradores (2012) |
| O00300 | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B | 1,2 | Rakic M. e colaboradores (2012) |
| Q9Y6Q6 | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A | 2,7 | Rakic M. e colaboradores (2012) |
| P02818 | Osteocalcin | 1 | Murata M. (2002) |
| P02818 | Osteocalcin | 1,5 | Tümer C. e colaboradores |

| | | | |
|---------------|---|------|---|
| | | | (2008) |
| P14780 | Matrix Metalloproteinase-9 | ↑ | Ma J. e colaboradores (2003) |
| P14780 | Matrix Metalloproteinase-9 | ↑ | Özçakir-Tomruk C. e colaboradores (2012) |
| Q9NPA2 | Matrix metalloproteinase-25 | ↑ | Kuula H. e colaboradores (2008) |
| Q9JHI0 | Matrix metalloproteinase-26 | ↑ | Kuula H. e colaboradores (2008) |
| P22894 | Neutrophil collagenase | ↑ | Arakawa H. e colaboradores (2012) |
| P22894 | Neutrophil collagenase | ↑ | Kivelä-Rajamäki M. e colaboradores (2003) |
| P22894 | Neutrophil collagenase | 9,7 | Kivelä-Rajamäki M. e colaboradores (2003) |
| P09237 | Matrylisin 1 | 11,3 | Kivelä-Rajamäki M. e colaboradores (2003) |
| P43235 | Cathepsin K | ↑ | Strbac GD e colaboradores (2006) |
| P05186 | Alkaline phosphatase | 5,9 | Plagnat D. e colaboradores (2002) |
| P08246 | Neutrophil Elastase | 12,8 | Plagnat D. e colaboradores (2002) |
| P01023 | Alpha 2-macroglobulin | 8,1 | Plagnat D. e colaboradores (2002) |
| P09429 | High mobility group protein B 1 | ↑ | Luo L. e colaboradores (2011) |
| P05204 | Nom-histone chromossomal protein HMG-17 | ↑ | Luo L. e colaboradores (2011) |

| | | | |
|---------------|--|------|---|
| P60022 | Beta Defensin-1 | ↑ | Kuula H. e colaboradores (2008) |
| P10147 | Macrophage inflammatory protein-1 alpha | ↑ | Petkovic AB e colaboradores (2010) |
| P02458 | Collagen alpha-1 (II) chain (C-telopeptide Pyridinoline) | 1,1 | Tümer C. e colaboradores (2008) |
| Q13753 | Laminin subunit gamma 2 | ↑ | Kivelä-Rajamäki M. e colaboradores (2003) |
| Q99857 | Tenascin-C | ↑ | Özçakir-Tomruk C. e colaboradores (2012) |
| P05164 | Myeloperoxidase | 14,4 | Liskmann S. e colaboradores (2004) |
| P05089 | Arginase 1 | | Queiroz e colaboradores (2009) |
| P35408 | Prostaglandin E2 | ↑ | Basegmez C. e colaboradores (2012) |

Proveniência da amostra

Da anotação das proteínas de periimplantite, 21 são provenientes do fluido crevicular, 15 da mucosa e 4 da saliva total (Figura 21).

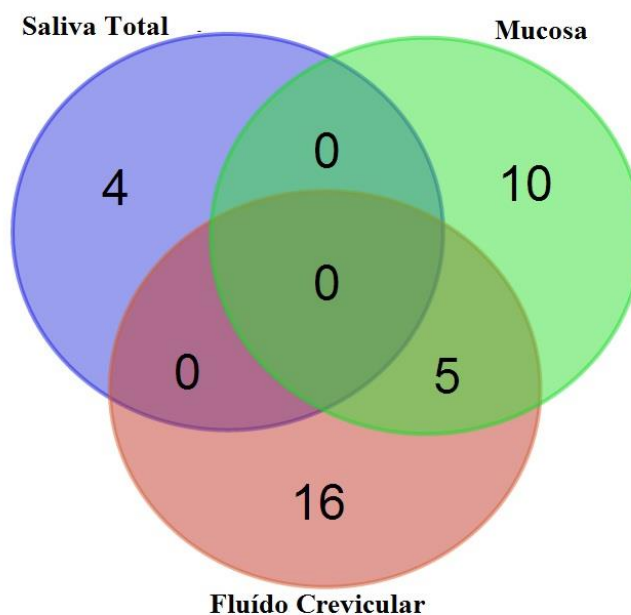


Figura 21- Diagrama de Venn representativo da distribuição das proteínas segundo a sua origem.

As proteínas que foram recolhidas no flúido crevicular assumem uma importância significativa, uma vez que a composição do segundo parece constituir um meio fidedigno para a deteção de mudanças precoces que podem indicar o início da doença, pois apresenta uma grande relação especificidade-sítio das amostras (3,9,20).

Relação com estado de saúde-doença

Das 36 proteínas identificadas como estando presentes em periimplantite, nenhuma foi identificada como exclusiva em estado de doença, ou seja, todas as 36 proteínas foram também identificadas em estado de saúde, podendo estar sub ou sobre reguladas.

Da análise da Tabela 1 é possível verificar que algumas proteínas, foram identificadas em diferentes estudos, como é o caso da *Osteocalcin*, *Matrix metalloproteinase-9* e *neutrophil collagenase*, *Tumor Necrosis factor ligand superfamily member 11* e *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11β*. *Tumor Necrosis factor ligand superfamily member 11*. O facto de estas proteínas serem identificadas em vários estudos, demonstra uma determinada certeza na sua relação com a patologia.

Consoante os resultados dos estudos experimentais que identificaram as proteínas (Tabela 1), foram calculados os valores de *fold change calculation* (Regulação). Este valor

quantifica a variação da proteína na doença em relação ao controlo saudável e, deste modo, facilita a interpretação das alterações moleculares observadas entre os dois estados.

A proteína myeloperoxidase foi a que apresentou um aumento da sua expressão (14,4). A myeloperoxidase é uma hemoproteína, que através da reação com o peróxido de hidrogénio forma radicais livres e substância oxidantes com atividade antimicrobiana (84). O facto desta proteína estar aumentada em periimplantite é coerente com a relação íntima entre esta patologia e a higiene oral, uma vez que a acumulação de placa bacteriana induz uma resposta inflamatória (84).

Duarte PM e colaboradores (2009) constataram que na periimplantite a concentração de RANKL estava aumentada em relação ao estado saudável, ao passo que a OPG apresentava uma concentração mais baixa na periimplantite. A expressão destas proteínas é fortemente regulada por mediadores inflamatórios e produtos bacterianos. A RANKL induz a formação de osteoclastos e a sua ativação, enquanto a OPG regula o RANKL e inibe a osteoclastogénese. Assim, pode-se inferir que uma desregulação na relação RANKL/OPG irá conduzir a uma maior atividade osteoclástica, com conseqüente aumento da reabsorção óssea. (65)

Ainda no mesmo estudo, Duarte PM e colaboradores (2009), identificaram a TNF- α aumentada no estado de periimplantite face ao estado saudável. A TNF- α é reconhecida como sendo essencial para a inflamação e destruição de tecidos por ativação de citocinas e quimiocinas, moléculas de adesão celular e fatores de transcrição (65).

Destaque também para a IL-6, identificada por Severino VO e colaboradores (2011), que é uma citocina pró-inflamatória sintetizada pelos monócitos, células endoteliais e fibroblastos, tendo ação tanto na resposta inata como na adaptativa. Esta proteína, juntamente com a TNF- α e a IL-1 β , apresenta potencial para a ativação dos osteoclastos (64).

Como é possível verificar na Tabela 1, foram identificadas várias MMPs (metaloproteinases). Estas constituem uma família da ECM (Extracellular Matrix) e estão implicadas em processos fisiológicos e patológicos, que incluem a morfogénese, a cicatrização de feridas, a reparação de tecidos e a progressão de doenças tais como a artrite, cancro, doenças cardiovasculares e doenças periodontais. As MMPs são as principais mediadoras destes processos, pois regulam as interações célula-célula e célula-ECM, que modificam a estrutura da matriz, a disponibilidade de fatores de crescimento e a função das

células de sistemas de sinalização, com os consequentes efeitos sobre a diferenciação celular, proliferação e apoptose (85).

Nos indivíduos portadores de diabetes melitos, fator de risco para o desenvolvimento de periimplantite, o fenótipo hiperglicémico promove o aumento da expressão de AGEs, induzindo o aumento da expressão de MMPs nos tecidos periodontais (86). Assim, pode-se concluir que na presença de uma maior concentração de AGEs haverá um aumento da expressão de MMPs nos tecidos periimplantares, podendo assim levar ao desenvolvimento de periimplantite.

Relativamente à Arginase 1, identificada no estudo de Queiroz e colaboradores (2009), não foram anotados dados em relação à sua regulação, uma vez que esta não era identificada na periimplantite. Este estudo relacionou a atividade da arginase com os hábitos tabágicos e o risco de desenvolver periimplantite (82).

Foi verificado um aumento da quantidade de arginase em pacientes fumadores e portadores de implantes. Este resultado indica que haverá uma menor produção de NO (óxido nítrico), pois a arginase utiliza o mesmo substrato que a enzima óxido nítrico sintetase, a L-arginina (82). O NO apresenta diversas funções fisiológicas no organismo tais como vasodilatação, modulação da neurotransmissão, inibição microbiana e do crescimento de células tumorais, regula a migração leucocitária e inibe a produção de superóxido (87). Assim, uma menor quantidade de NO na saliva diminui as propriedades antimicrobianas desta e torna os tecidos periodontais e periimplantares mais suscetíveis aos patógenos existentes, levando a uma maior adesão bacteriana em redor dos implantes e consequentemente conduzir ao desenvolvimento de periimplantite (20).

Caracterização dos indivíduos da amostra

Foram recolhidos dados relativamente à faixa etária, género e hábitos sociais, de forma a caracterizar os indivíduos da amostra. Estes dados são importantes para a interpretação dos resultados de proteómica, pois podem constituir fatores na sub ou sobre expressão das proteínas.

No que respeita à análise da faixa etária obteve-se um intervalo compreendido entre 18 e 88 anos de idade. Considerando os efeitos do envelhecimento, como por exemplo a acumulação de alterações genómicas, com impacto na realização dos processos biológicos, a

interferência com o metabolismo e todas as alterações resultantes do envelhecimento na cavidade oral que vão alterar a composição salivar, é possível inferir que haja alterações de expressão de algumas proteínas (88).

Relativamente à análise dos géneros, não se pode inferir qualquer tipo de informação, visto que todos os estudos analisados continham na amostra indivíduos do sexo feminino e masculino, não fazendo qualquer tipo de distinção e análise entre estes.

Nos estudos analisados, o tabagismo foi o único hábito social descrito, visto que todos os outros hábitos eram fatores de exclusão nesses estudos. O tabagismo tem vários efeitos locais e sistémicos no organismo humano. Os efeitos locais são regulados por substâncias citotóxicas e vasoativas como a nicotina contida no tabaco. Sistemicamente, o tabagismo afeta negativamente a resposta imunológica do organismo, o que resulta num distúrbio nas funções dos neutrófilos a nível oral e periférico, provoca vasoconstrição, limita a produção de anticorpos e afeta a imunorregulação das células T a nível periférico (82). Assim, a presença de um hábito social como o tabagismo pode exponenciar ou diminuir a expressão de proteínas.

Métodos de recolha e análise

Os estudos analisados foram estudos dirigidos, uma vez que não há ainda estudos de proteómica em periimplantite. Estes estudos dirigidos identificam um número reduzido de proteínas e, normalmente, são identificadas aquelas em que existiam evidências da sua possível implicação na doença, ou seja, estes estudos dirigidos identificam proteínas que poderão desempenhar um papel importante na patologia da periimplantite.

A anotação dos métodos de amostragem e análise é importante, pois a diversidade de técnicas pode influenciar a deteção de proteínas, podendo tornar difícil a comparação de dados entre estudos.

Características especiais

Neste item de informações foram anotadas as proteínas que os autores propuseram como biomarcadores.

Da análise dos estudos, anotou-se que Arakawa H. e colaboradores (2012) propuseram a MMP-8 como um marcador de perda óssea em periimplantite e Plagnat D. e colaboradores (2002) identificaram a *Alkaline Phosphatase* e a *neutrophil elastase* como promissores marcadores de perda óssea ao redor de implantes dentários.

A identificação, quantificação e aplicação de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico continua a ser “o santo graal” do atual paradigma das ciências Ómicas. Do ponto de vista da análise de dados, a descoberta de biomarcadores pode ser vista como um processo de desenvolvimento interativo e incremental (89).

Sendo a implantologia uma prática crescente nos dias que correm e para a qual se prevê um contínuo crescimento de procura, a busca de biomarcadores para esta patologia pode ser um elemento chave para o diagnóstico precoce da doença, prevenção, tratamento, avaliação da sua progressão e implementação de terapêuticas adequadas de forma a aumentar a taxa de sobrevida e qualidade dos implantes dentários.

A principal característica que torna uma proteína um biomarcador fidedigno é a sua especificidade, ou seja, ser exclusiva em periimplantite ou encontrar-se em grande quantidade no estado de doença, quando comparado com o estado de saúde.

Resultados de estudos como os anteriormente referidos aumentam a possibilidade do uso da saliva como fluído de diagnóstico válido e fidedigno. No entanto, torna-se crucial a validação destes biomarcadores, através de ensaios clínicos com uma amostra maior.

No entanto, atualmente, o estabelecimento de um perfil molecular característico de uma doença é mais importante, uma vez que confere um leque maior de informações em relação à patologia, comparativamente a um biomarcador.

CARACTERIZAÇÃO DO PROTEOMA DA PERIIMPLANTITE

De acordo com o descrito nos “Materiais e Métodos”, recorreu-se à utilização da ferramenta PANTHER – *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships* – (<http://panther.org>) (58) para realizar a classificação funcional das proteínas da periimplantite, de acordo com as suas ontologias génicas.

Funções moleculares das proteínas da periimplantite

Recorreu-se à ferramenta PANTHER para catalogar as proteínas características da periimplantite de acordo com a ontologia “*Molecular Function*”. Esta análise permitiu catalogar as funções moleculares em que intervêm as proteínas da periimplantite (Figura 22).

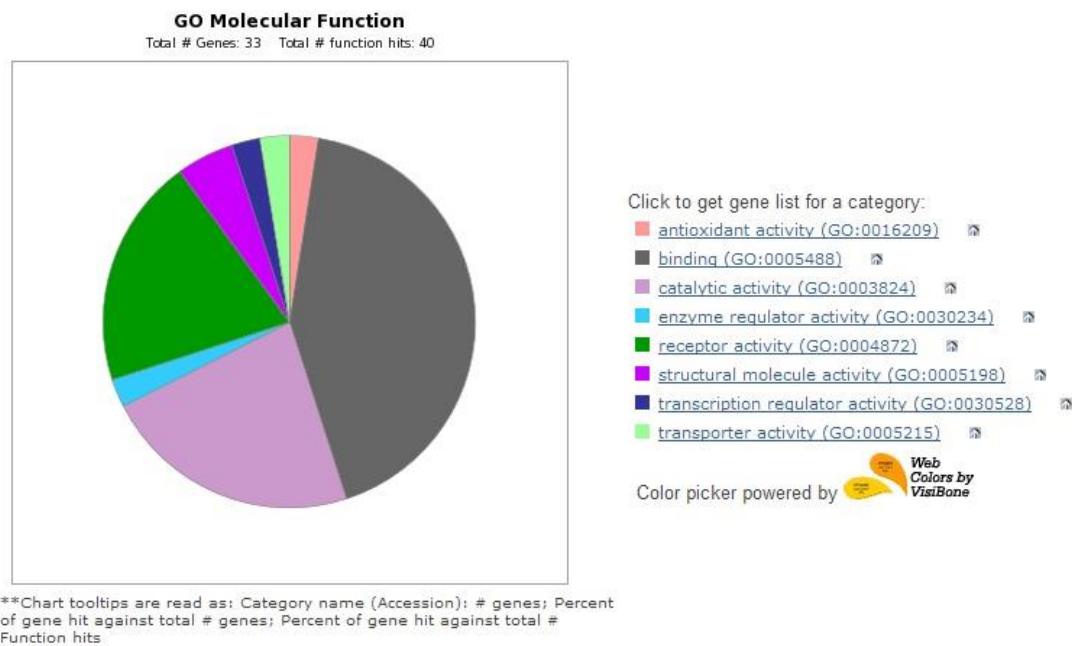


Figura 22 - Gráfico representativo da distribuição das proteínas da periimplantite anotadas na ontologia “Molecular Function” do PANTHER.

Da análise da Figura 22 é possível verificar a existência de 3 grandes grupos e 6 pequenos grupos. O maior grupo é o de atividade de “*binding*”, seguido pelo “*catalytic activity*” e “*receptor activity*”

Como a Figura 22 indica, uma parte significativa das proteínas de periimplantite têm como função “*catalytic activity*”. Se avaliarmos a subdivisão (PANTHER) das enzimas que possuem a função de “*catalytic activity*” obtemos a seguinte figura (Figura 23):

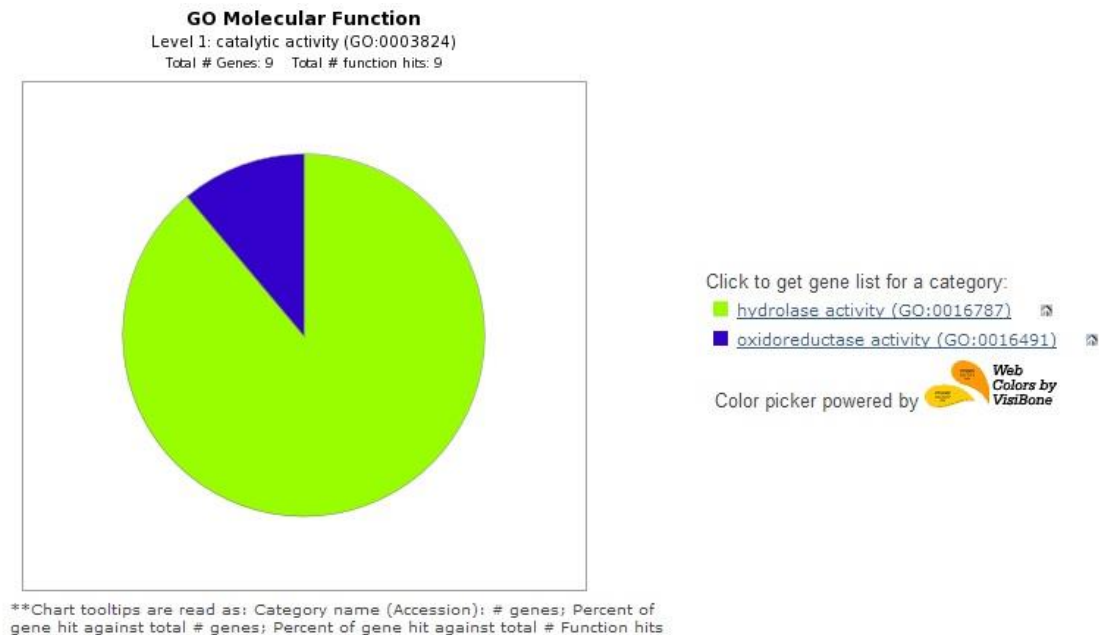


Figura 23 - Gráfico da distribuição das proteínas da periimplantite anotadas no nível 1 da ontologia “Molecular Function” do PANTHER na função catalytic activity.

Ao analisar a Figura 23 é possível inferir que grande parte das proteínas envolvidas na função “*catalytic activity*” estão por sua vez envolvidas na função “*hydrolase activity*”. Se avaliarmos a subdivisão (PANTHER) das enzimas que possuem a função “*hydrolase*” obtemos a seguinte figura (Figura 24):

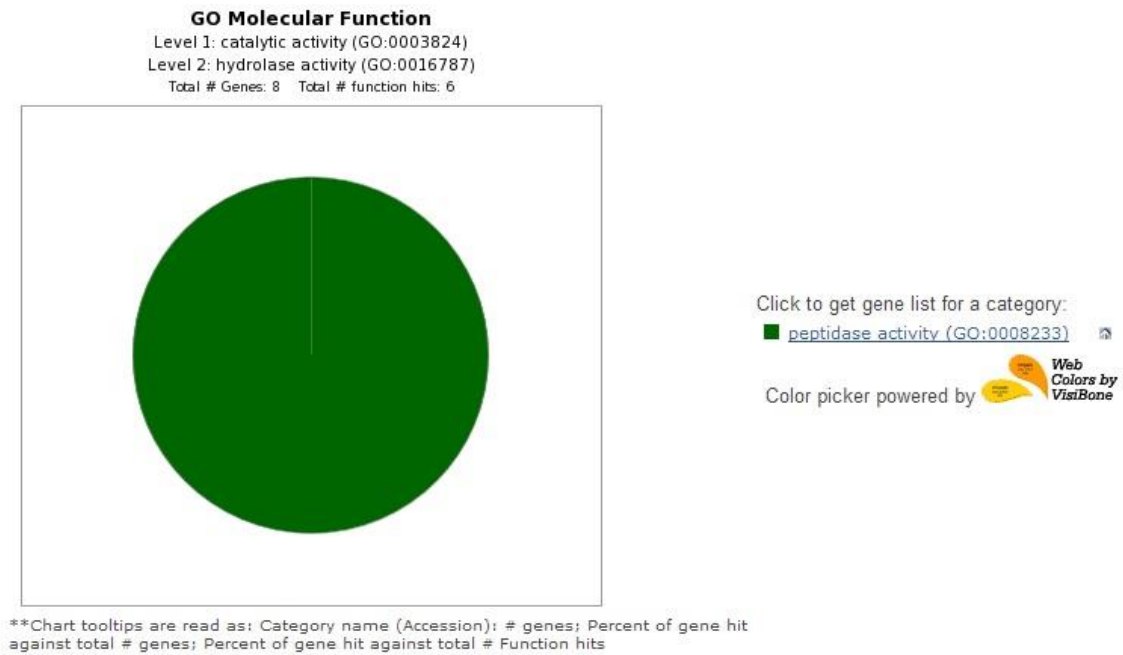


Figura 24 - Gráfico da distribuição das proteínas da periimplantite anotadas no nível 2 da ontologia “Molecular Function” do PANTHER na função hydrolase.

Ao analisar a Figura 24 é possível concluir que todas as proteínas envolvidas na função de “*hydrolase activity*” estão envolvidas na função de “*peptidase activity*”. Sendo as peptidases enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas e estando envolvidas em cascatas como a da coagulação e as vias da apoptose, podem assim estar relacionadas com a destruição óssea em redor do implante dentário, por processos apoptóticos.

Processos biológicos das proteínas da periimplantite

Recorreu-se à ferramenta PANTHER para catalogar as proteínas características da periimplantite de acordo com a ontologia “*Biological Process*”. Esta análise permitiu catalogar os processos biológicos em que intervêm as proteínas da periimplantite (Figura 25).

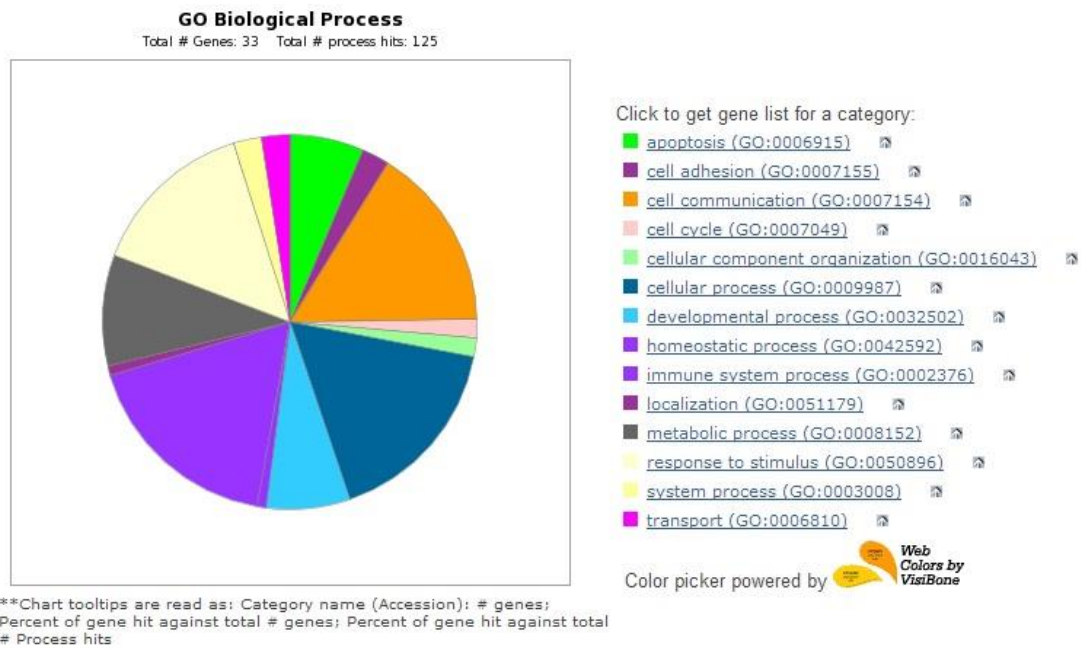


Figura 25 - Gráfico representativo da distribuição das proteínas da periimplantite anotadas na ontologia “Biological Process” do PANTHER.

A análise da Figura 25 permite concluir que as proteínas da periimplantite estão envolvidas em 14 processos biológicos, sendo o processo “*immune system process*” o que mais proteínas envolve, seguido do processo “*cellular process*” e “*cell communication*”.

Destaque ainda para o processo biológico “*Apoptosis*”, que vem corroborar o anteriormente sugerido aquando da análise funcional.

Vias de sinalização das proteínas de periimplantite

Recorreu-se à ferramenta PANTHER para catalogar as proteínas características da periimplantite de acordo com a ontologia “*Pathways*”. Esta análise permitiu catalogar as vias de sinalização em que as proteínas da periimplantite intervêm (Figura 26).

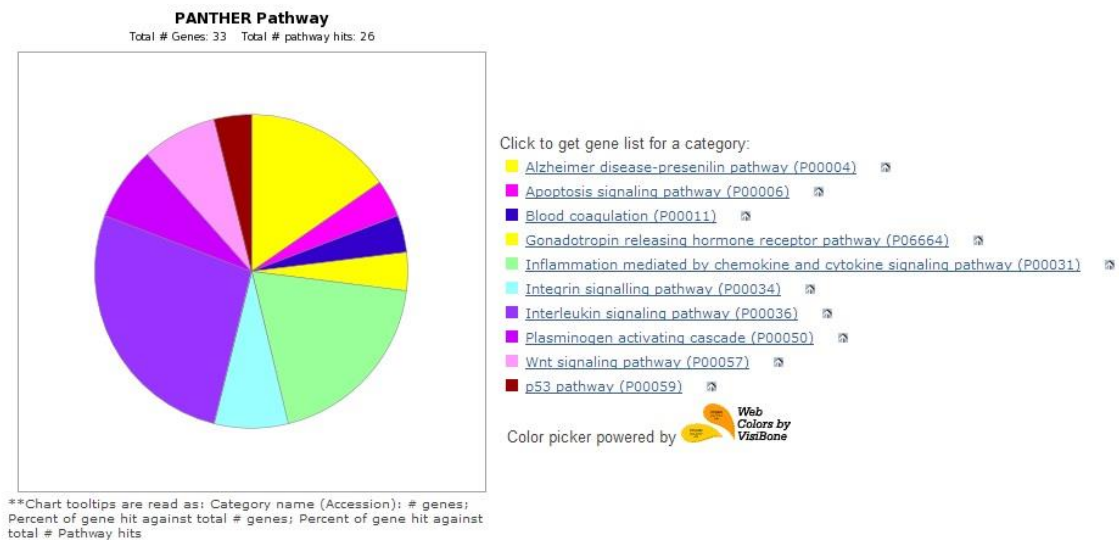


Figura 26 - Gráfico da distribuição das proteínas da periimplantite anotadas na ontologia “Pathway” do PANTHER.

Após a análise da Figura 26 conclui-se que as proteínas da periimplantite estão envolvidas em 10 vias de sinalização, sendo a via de sinalização “*interleukin signaling Pathway*” a que mais proteínas envolve, seguida da “*inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling Pathway*” e “*alzheimer disease-presenilin Pathway*”. Destaque ainda para a via de sinalização “*Apoptosis signaling Pathway*”, pois vem corroborar o anteriormente sugerido na análise das funções moleculares e processos biológicos.

COMPARAÇÃO COM O ORALOMA NORMAL

Esta análise determinou estatisticamente se as diferentes ontologias das proteínas de periimplantite se encontravam com valores aumentados ou diminuídos em relação aos esperados, comparativamente a indivíduos saudáveis (OralOma normal).

Comparação das funções moleculares

Após a obtenção das funções moleculares através da ferramenta PANTHER, foi possível observar a comparação desta ontologia na periimplantite com a do OralOma normal (Figura 27).

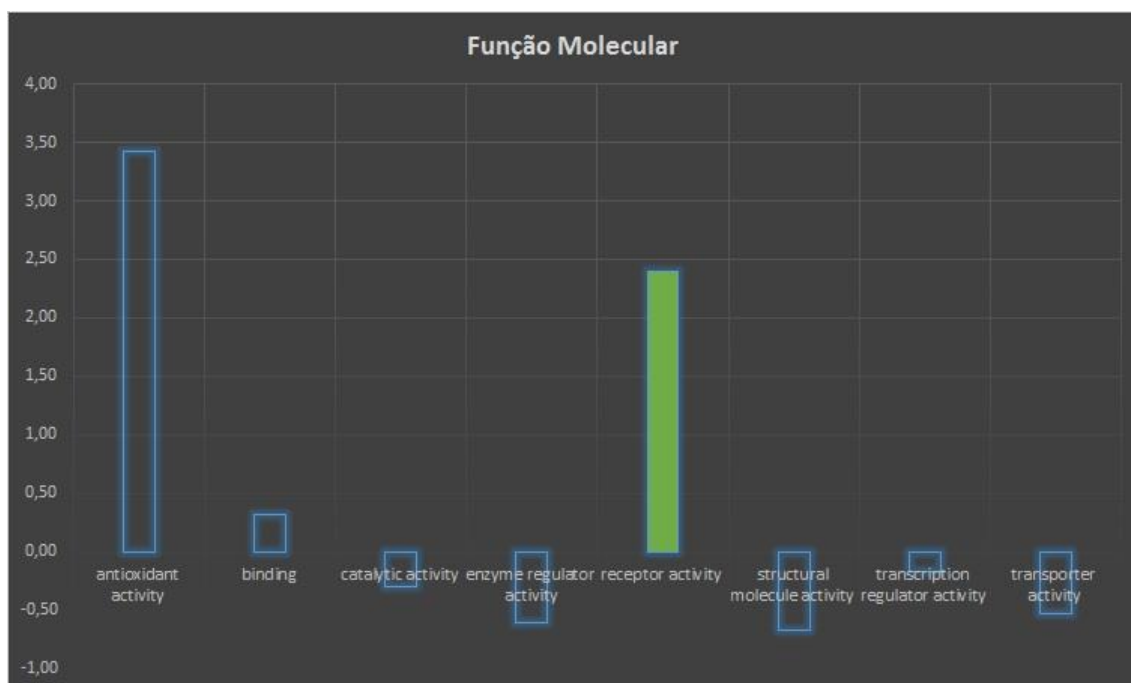


Figura 27 - Distribuição das proteínas identificadas em pacientes com periimplantite segundo as funções moleculares em que intervêm, recorrendo à ferramenta PANTHER. É mostrada a diferença fracional entre as proteínas da periimplantite e o OralOma normal. As barras com coloração verde indicam as funções moleculares com uma alteração em relação ao OralOma normal considerada estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Pela análise da Figura 27 destaca-se, com relevância estatisticamente significativa para a periimplantite (barras coloridas a verde), alterações na “*Receptor activity*”, com um *p-value* $< 0,01$, comparativamente com o OralOma normal.

Comparação dos processos biológicos

Após a obtenção dos processos biológicos através da ferramenta PANTHER, foi possível observar a comparação desta ontologia na periimplantite com a do OralOma normal (Figura 28).

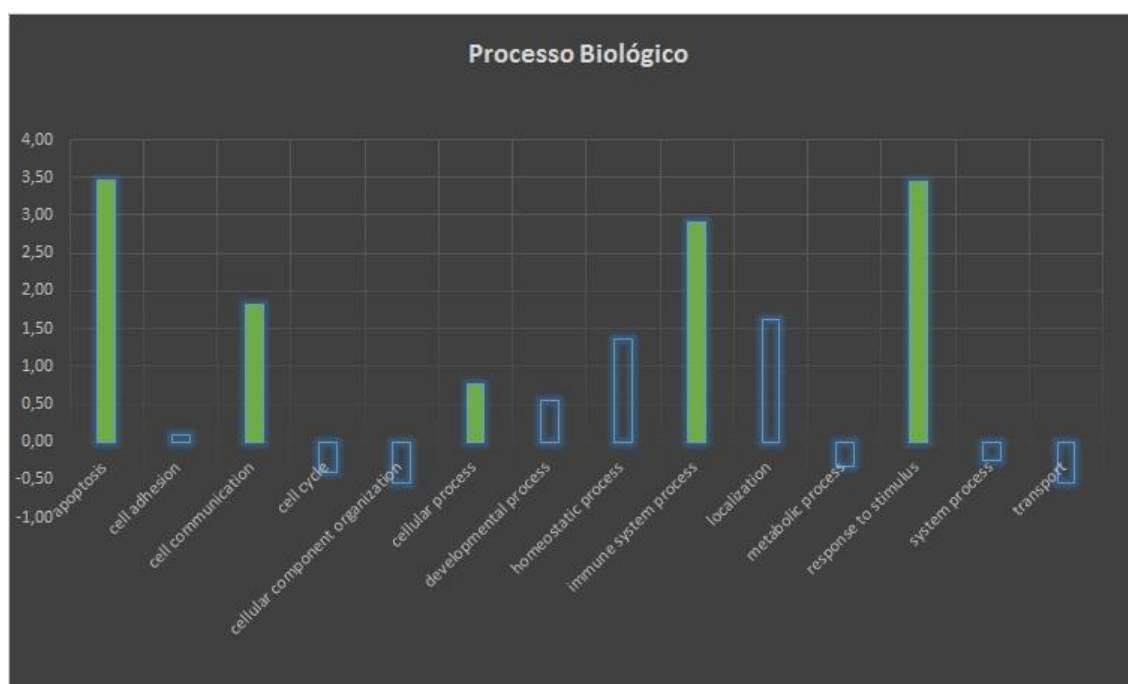


Figura 28 - Distribuição das proteínas identificadas em pacientes com periimplantite segundo os processos biológicos em que intervêm, recorrendo à ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003). É mostrada a diferença fracional entre as proteínas da periimplantite e o OralOma normal. As barras com coloração verde indicam os processos biológicos com uma alteração em relação ao OralOma normal considerada estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Pela análise da Figura 28 destacam-se, com relevância estatisticamente significativa para a periimplantite (barras coloridas a verde), alterações na “*Apoptosis*”, com um p -value $< 0,01$, na “*Cell communication*”, com um p -value $< 0,01$, na “*Cellular process*”, com um p -value $< 0,01$, no “*Immune system process*”, com um p -value $< 0,01$, e na “*Response to stimulus*”, com um p -value $< 0,01$, comparativamente com o OralOma normal.

A presença aumentada de proteínas pertencentes a alguns destes processos biológicos alterados na periimplantite é consistente com o conhecimento acerca da presença de inflamação associada à patologia.

Um dos processos biológicos mais alterado na periimplantite em relação ao OralOma normal, como é possível verificar na Figura 28, é o processo “*Apoptosis*”. O facto de existirem proteínas identificadas no proteoma oral da periimplantite envolvidas neste processo, leva ao estabelecimento de uma provável relação entre a periimplantite e os processos apoptóticos, podendo estes processos serem uma das razões pela perda tecidual em redor do implante dentário.

Comparação das vias de sinalização

Após a obtenção das vias de sinalização através da ferramenta PANTHER, foi possível observar a comparação desta ontologia na periimplantite com a do OralOma normal (Figura 29).

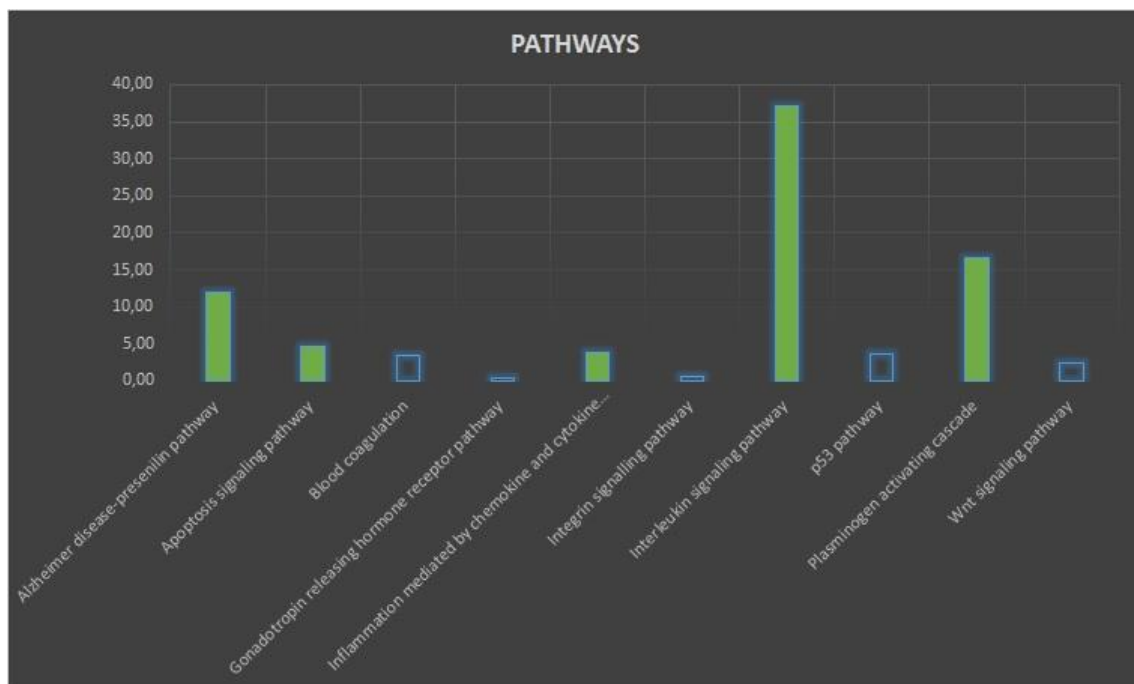


Figura 29 - Distribuição das proteínas identificadas em pacientes com periimplantite segundo as vias de sinalização em que intervêm, recorrendo à ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003) . É mostrada a diferença fracional entre as proteínas da periimplantite e o OralOma normal. As barras com coloração verde indicam as vias de sinalização com uma alteração em relação ao OralOma normal considerada estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Pela análise da Figura 29 destaca-se, com relevância estatisticamente significativa para a periimplantite (barras coloridas a verde), alterações na “*Alzheimer disease-presenilin pathway*”, com um p -value < 0,01, a “*Apoptosis signaling pathway*”, com um p -value < 0,05,

a “*inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway*”, com um *p-value* < 0,01, “*Interleukin signaling pathway*”, com um *p-value* < 0,01, e no “*Plasminogen activating cascade*”, com um *p-value* < 0,01, comparativamente com o OralOma normal.

A alteração das vias “*Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway*” e “*Interleukin signaling pathway*” são, de facto, normais, uma vez que há várias proteínas identificadas na periimplantite resultante da resposta inflamatória a esta patologia.

A presença aumentada de proteínas pertencentes à via de sinalização “*Apoptosis signaling pathway*” alterada na periimplantite, vem corroborar a ideia, já anteriormente referida, que a apoptose pode ser um dos processos pelo qual há perda tecidual em redor dos implantes dentários.

IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA

Para a identificação de potenciais interações moleculares foi traçada a rede de interações proteína-proteína implicadas em periimplantite (Figura 30), com recurso à ferramenta bioinformática STRING.

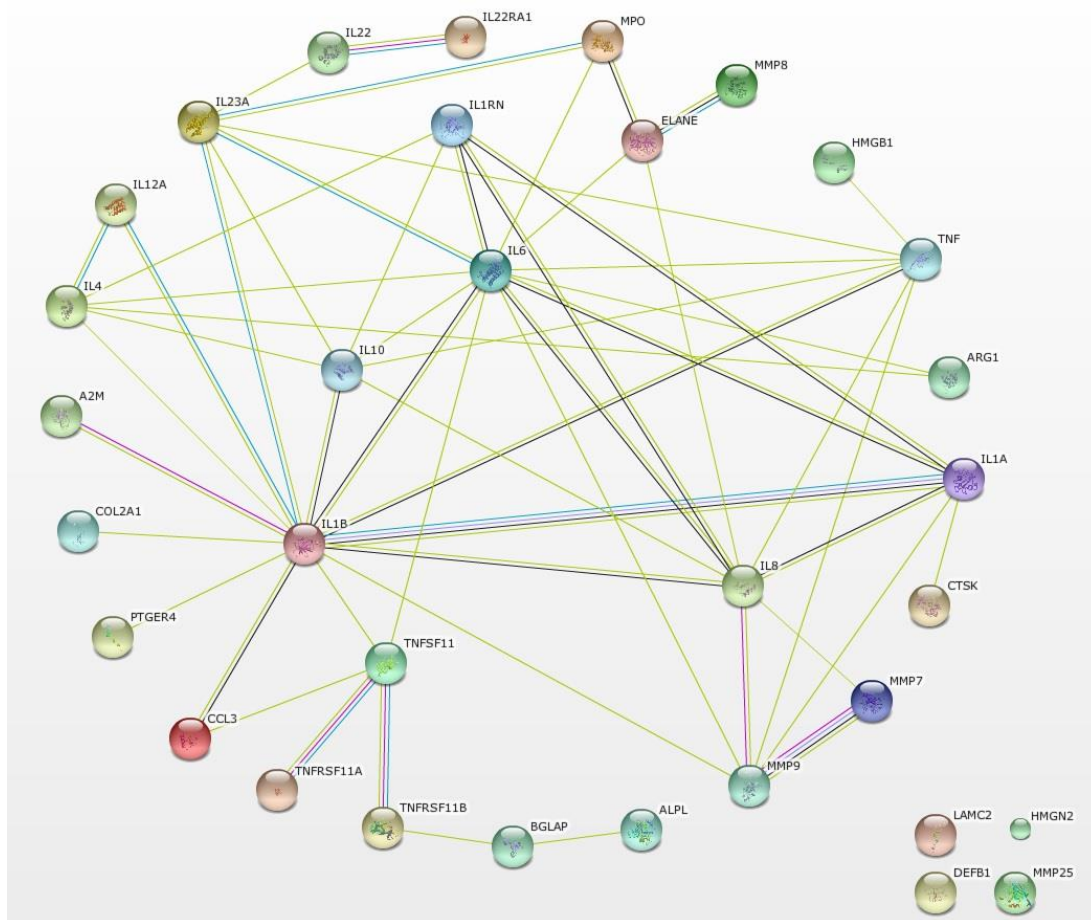


Figura 30 - Rede interatômica das proteínas identificadas na periimplantite (Confidence > 0,9). Imagem gerada pela ferramenta STRING.

Da análise da Figura 30, verifica-se que a IL-6 e a IL-1 β são as proteínas que apresentam o maior número de interações.

Após análise, de acordo com as ontologias disponíveis no STRING, da rede de PPIs, foi possível relacionar algumas vias de sinalização e processos biológicos com as proteínas identificadas no proteoma de periimplantite.

Apoptose e a TNF- α

A Figura 31 demonstra a via de sinalização “Apoptosis”, identificada no STRING. É possível verificar, pela análise dessa figura, que a TNF- α , IL-1 α e IL-1 β se encontram identificadas nessa via de sinalização.

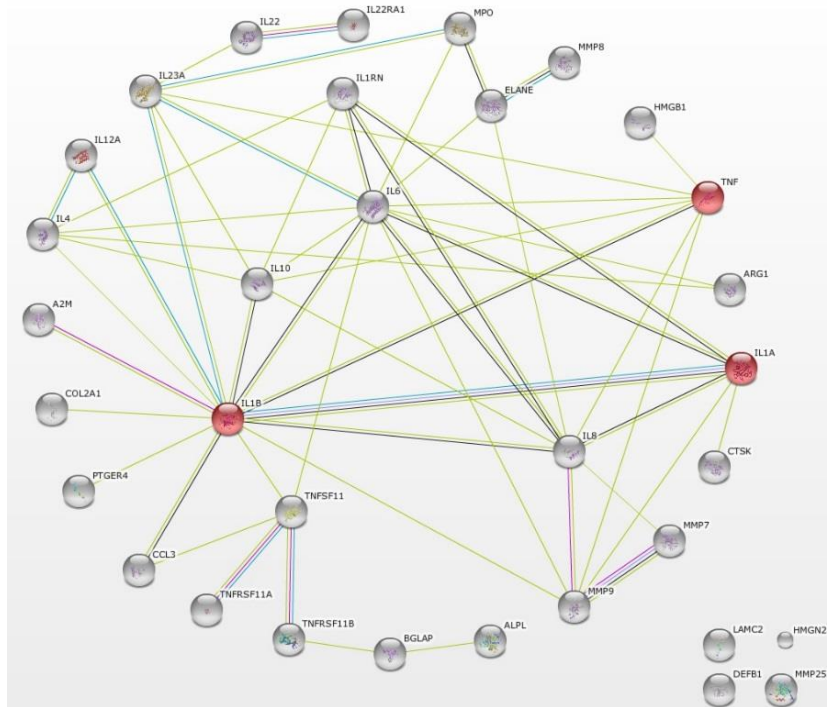


Figura 31 - Proteínas que estão identificadas na via de sinalização da apoptose identificada na rede interactiva das proteínas identificadas na periimplantite.

O TNF- α é uma citocina com papel importante na patologia da perda óssea, causada pela inflamação crónica, tendo também importância noutras doenças (90).

Um aumento local ou sistémico na concentração de TNF- α conduz à desregulação complexa do metabolismo ósseo, favorecendo a destruição deste ao aumentar a diferenciação e ativação dos osteoclastos, mas também inibindo a formação óssea, bloqueando a diferenciação e atividade dos osteoblastos, bem como induzindo a sua apoptose (90).

A apoptose é uma via de morte celular programada, caracterizada por deflagração da membrana plasmática, condensação nuclear e fragmentação do DNA nucleossomal. A apoptose pode ser desencadeada por uma célula, quer por via intrínseca, quer extrínseca. A via extrínseca é iniciada através da estimulação dos recetores apoptóticos transmembranares, tais como receptores Fas/CD95/Apo-1 e TNFR1. Contrariamente, a via intrínseca é iniciada

através da libertação de fatores pela mitocôndria dentro da célula, que é desencadeada por diversos eventos celulares anormais. Um estudo realizado em 2013 demonstrou que a TNF- α se pode ligar a dois recetores diferentes, o TNFR1 ou p55 e p75 ou TNFR2. Tem sido descrito que a ligação de TNF- α ao TNFR1 forma um ativador de sinais pró-apoptóticos em osteoblastos (90).

Além disso, verificou-se que a TNF- α induz a proteína Fas na linha celular MG-63 no osteossarcoma humano e em células MC3T3-E1 no rato (90). Um estudo de Ozeki e colaboradores (2002) confirmou que a Fas desempenha um papel importante na indução da apoptose por parte da TNF- α nas células MC3T3-E1. Contudo, os eventos moleculares exatos subjacentes ao efeito do TNF- α nas vias apoptóticas em osteoblastos precisam ser mais investigados, uma vez que o mecanismo exato da apoptose induzida pela TNF- α em osteoblastos é ainda pouco conhecido (90).

Como foi possível verificar nas Figura 27, 29 e 31, a apoptose pode ser um dos processos que conduz à perda óssea na periimplantite, uma vez que a sua expressão se encontra aumentada em relação ao OralOma normal. Se juntarmos estes factos com a identificação da TNF- α em concentrações elevadas em redor dos implantes com periimplantite (Tabela 1), podemos inferir que uma das possíveis vias que conduz à perda óssea na periimplantite é a apoptose, uma vez que a TNF- α poderá induzir a apoptose nos osteoblastos, levando assim ao decréscimo de produção óssea.

AS MAPKs e os osteoclastos

A Figura 32 demonstra que existem proteínas identificadas no proteoma da periimplantite que estão envolvidas na via de sinalização das MAPKs. Por sua vez, as figuras 33, 34 e 35 demonstram que existem proteínas que têm como processos biológicos a regulação positiva das cascatas de MAPK, a regulação das cascatas da JNK e regulação positiva das cascatas de ERK1 e ERK2 pela via de sinalização mediada por TNFSF11 (RANKL).

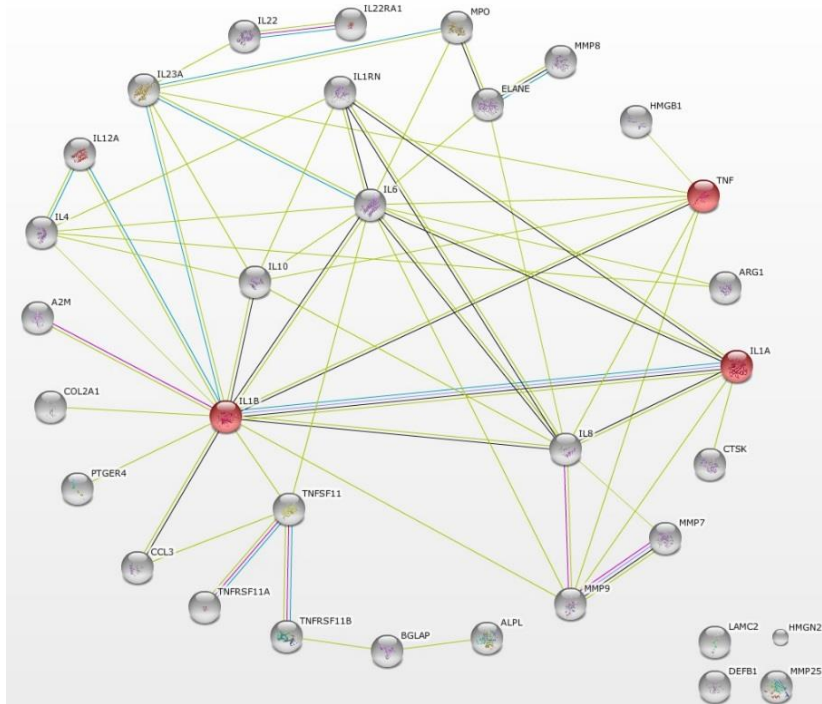


Figura 32 - Proteínas que estão identificadas na via de sinalização das MAPK identificada na rede interactiva das proteínas identificadas na periimplantite.

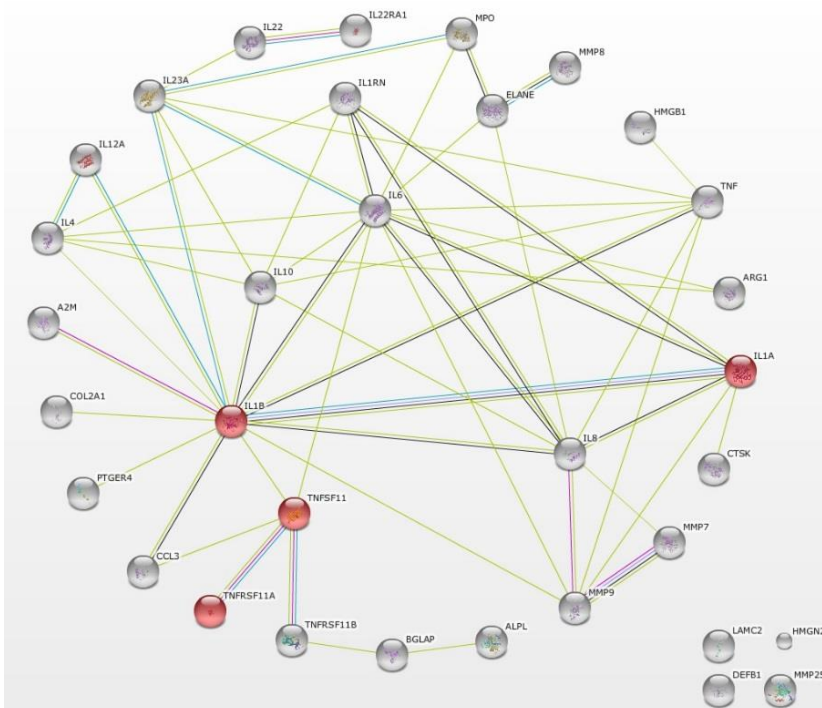


Figura 33 Proteínas que estão identificadas no processo biológico que regulam positivamente as cascatas de MAPK identificada na rede interactiva das proteínas identificadas na periimplantite.

As MAPKs constituem uma família de serina/treonina que transferem uma grande variedade de sinais extracelulares em respostas celulares, como o crescimento celular, diferenciação e apoptose. As três principais subfamílias das MAPKs são: a cinase regulada por sinal extracelular (ERK), o c-Jun NH2-terminal cinase (JNK), e a p38-MAPK. Cada membro destas subfamílias apresenta também, por sua vez, subfamílias: as ERKs apresentam a ERK1 e ERK2 como subfamília, por sua vez as JNKs apresentam como subfamílias a JNK1, JNK2 e JNK3, e por fim a p38-MAPKs têm como subfamílias a P38-MAPKa, P38-MAPKb, p-38 MAPKd, p38 e MAPKd (91, 92).

ERK1 e ERK2 ativam as MAPKs em resposta a estímulos de crescimento. As JNKs e a p38 MAPK são ativadas simultaneamente em resposta a uma variedade de tensões celulares e ambientais, tais como mudanças na osmolaridade ou metabolismo, danos no DNA, choque térmico, isquemia, citocinas inflamatórias, *stress* oxidativo e irradiação UV (92).

Muitos dos estímulos que induzem a p38-MAPKs e JNKs, denominadas cinases de *stress*, tal como o choque térmico, a TNF- α , a irradiação UV e a citocalasina D, vão também ativar outras cascatas de MAPK (92).

As diferentes vias de MAPK controlam e determinam o destino celular em resposta a uma variedade de estímulos. As vias de MAPKs desempenham um papel importante na regulação de algumas moléculas, tais como os fatores de transcrição e tradução, moléculas do ciclo celular ou cinases, exercendo assim uma grande variedade de ações celulares, incluindo a proliferação celular, a paragem do ciclo celular, a migração, a diferenciação e a apoptose. A sinalização por MAPK pode proteger ou melhorar a sensibilidade à apoptose, dependendo do tipo de célula, dos estímulos e do tempo de latência do acionamento das MAPKs. Estes últimos alvos a jusante, tipo de célula, cruzamentos moleculares específicos do ciclo celular ou cinética e tempo de ativação podem influenciar os efeitos da MAPK na apoptose. O balanço destes efeitos poderá determinar o destino celular (92).

A RANKL e o seu recetor RANK são reguladores chave na remodelação óssea, pois são essenciais para o desenvolvimento e ativação dos osteoclastos (93). O TRAF (*TNF Receptor associated factor*), é uma proteína adaptadora que desempenha um papel importante no evento inicial da via de transdução de sinal induzida por RANK. Das proteínas da TRAF, a TRAF 6 é fundamental para a sinalização mediada por RANK nos osteoclastos (94).

As proteínas da TRAF atuam transmitindo para jusante os sinais da RANK. Estas proteínas têm 2 principais alvos, a NF-KB (*Nuclear Factor-kappa B*) e a JNK. A NF-KB

encontra-se no citoplasma, formando um complexo com a I-KB (*Inhibitor of Kappa Light Chain Gene Enhancer in B-Cells*) em células não estimuladas. Os estímulos que ativam NF-KB, induzem a ativação de IKKs (*I-KappaB cinases*), resultando na fosforilação e, conseqüentemente, provocam a degradação da I-KB mediada pelo proteassoma. O NF-kB, após ser libertado, entra no núcleo celular onde se liga aos locais alvo do DNA. Os eventos ocorridos após a estimulação da RANK em osteoclastos diferenciados ou de células precursoras de osteoclastos incluem a fosforilação e degradação do *I-KappaB-alpha*, a translocação nuclear e a ligação das proteínas NF-KB p50, p52 e p65 ao DNA (95).

Outras proteínas adaptadoras intracelulares que interagem com as proteínas TRAF e que regulam a função destas nos osteoclastos são as TAK1 (*TGF-Beta Activated Kinase*) e a NIK (*NF-KappaB-Inducing Kinase*) (95). O conjunto destes eventos vão levar a um aumento da expressão génica dos osteoclastos (Figura 36).

Os membros das 3 subfamílias da MAPK (ERKs, JNK e p38MAPKs), são ativadas por RANK em osteoclastos ou precursores destes. JNK1 é muito importante na diferenciação dos osteoclastos. Um dos alvos a jusante de MKK7 é a ativação da JNK na via de sinalização da RANK. A Raf está envolvida na ativação da via de transdução de sinal de ERK envolvendo CD40, um recetor da família da TNFR, que apresenta características semelhantes às de sinalização da RANK (96).

A atividade de TAK1/TAB2 induz a ativação da JNK e P38 a jusante da TRAF6 na via de sinalização da RANK. Os alvos a jusante das ERKs e JNKs incluem o fator de transcrição AP1 (*Activating Protein-1*), composto por c-FOS e c-Jun. ERK induz e ativa a c-FOS e NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-Cells*) pela fosforilação de Elk1, que faz parte da TCF (*Ternary Complex Factor*), enquanto a JNK aumenta a atividade transcripcional da AP1 através da fosforilação da c-Jun. Outro fator de transcrição, MITF (*Microphthalmia-Associated Transcription Factor*), é um alvo da p38 na via de sinalização RANK nos osteoclastos (97). O conjunto destes eventos leva a um aumento da expressão génica dos osteoclastos, pela diferenciação destes (Figura 36).

XIAP (*Xenopus Inhibitor of Apoptosis*) e cIAP têm alvos a jusante, como a NF-KB, na via de sobrevivência dos osteoclastos (95). Também a ERK 1/2 participa na via de sobrevivência dos osteoclastos, ao inibir a apoptose destes (Figura 36).

A Src actua como um mediador do sistema RANK para PI3K (*Phosphatidylinositol-3 Kinase*)/Akt1. Das muitas moléculas a jusante de Src, PYK2 (*Protein Tyrosine Kinase -2*) e c-

Cbl estão envolvidos na sinalização de adesão dos osteoclastos e na função de reabsorção óssea. Adicionalmente, a associação entre a actin e gelsolin com PI3K é importante na formação de filamentos de actina em osteoclastos. A função de Src e PI3K é transmitir os sinais para uma adequada organização do citoesqueleto de actina que facilitará a atividade de reabsorção dos osteoclastos (98) (Figura 36).

A Figura 36 apresenta de forma esquematizada os processos anteriormente descritos.

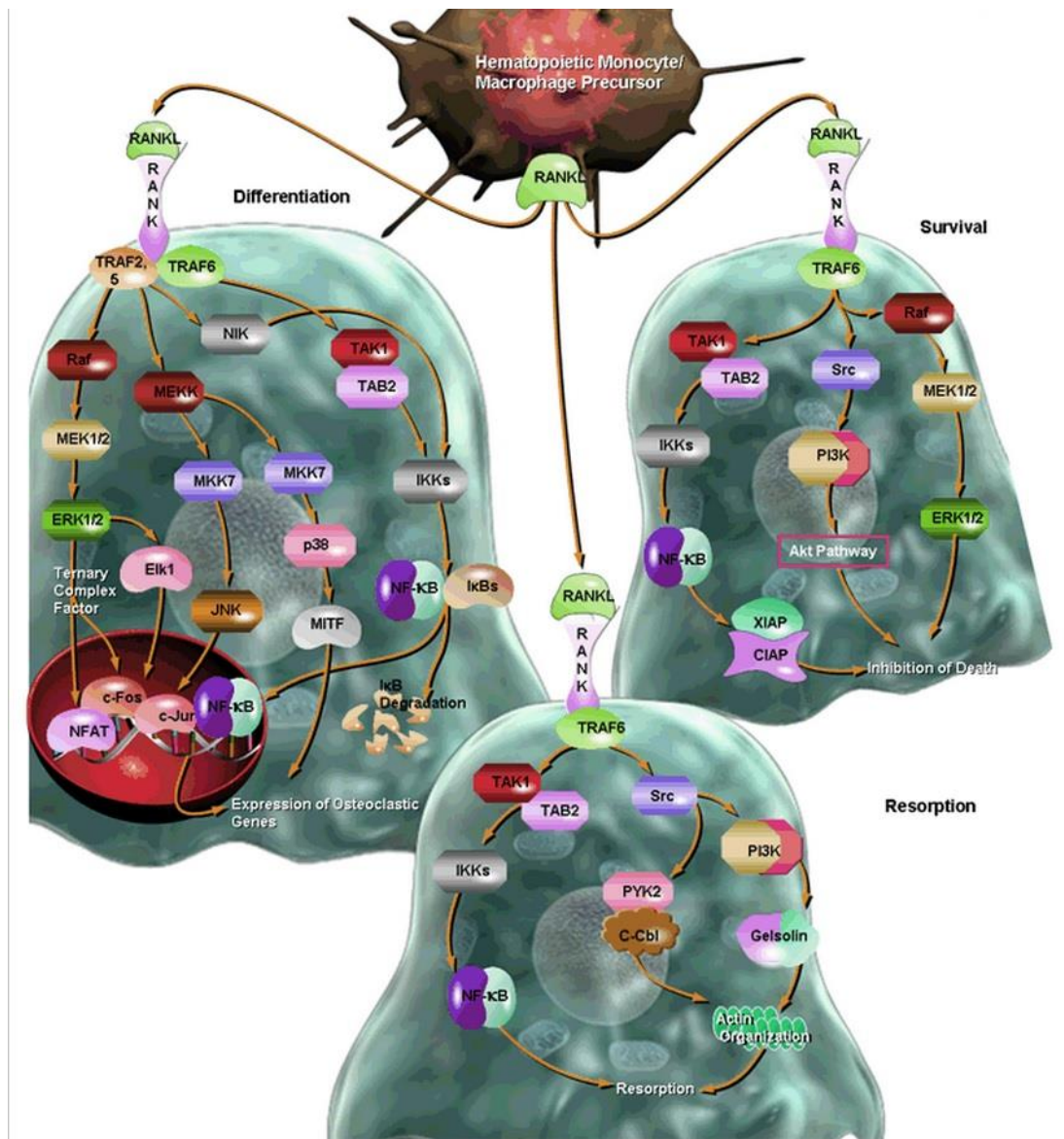


Figura 36 - Esquema dos processos implicados na diferenciação, reabsorção e sobrevivência dos osteoclastos.

Como foi possível verificar nas Figuras 33, 34 e 35, existem proteínas que vão participar em processos biológicos que estão envolvidos na osteoclastogênese. No proteoma da periimplantite (Tabela 1), é possível observar que as concentrações de RANK e RANKL

se encontram aumentadas no estado de periimplantite em relação ao estado saudável, que por sua vez se encontram identificadas nos processos biológicos identificados nas Figuras 33,34 e 35.

Estas duas proteínas são consideradas proteínas-chave na remodelação óssea, pois são essenciais para o desenvolvimento dos osteoclastos, como é possível observar na Figura 36 e como anteriormente descrito. Assim, é possível sugerir que a elevada concentração destas no estado de periimplantite vai ativar e aumentar a osteoclastogénese, levando, desta forma, a uma perda acentuada de osso em redor do implante dentário.

GLICO-ORALOMA DA PERIIMPLANTITE

Os estudos de proteómica oral selecionados para identificação do proteoma humano da periimplantite, não referiam qualquer PTM das proteínas que identificaram, o que impossibilitou o estabelecimento do Glico-OralOma da periimplantite.

Do total de proteínas identificadas, 28 demonstraram sofrer glicosilações noutros pontos anatómicos que não a cavidade oral, como é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Proteínas humanas da periimplantite que sofrem Glicosilações noutros tecidos, que não os da cavidade oral.

| UniProtKB AC | Nome da proteína | Sofre Glicosilação |
|-----------------|---|--------------------|
| P18510 | Interleukin-1 receptor antagonist protein | X |
| P01583 | Interleukin-1 Alpha | X |
| P05112 | Interleukin-4 | X |
| P05231 | Interleukin-6 | X |
| P22301 | Interleukin-10 | X |
| Q9GZX6 | Interleukin 22 | X |
| Q8N6P7 | Interleukin 22 receptor | X |
| O14788 | Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11 (RANKL) | X |
| O00300 | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B (Osteoprotegerin) | X |
| P01375 | Tumor factor necrosis (TNF-Alpha) | X |
| O14788 | Tumor Necrosis factor ligand superfamily member 11 (RANKL) | X |
| O00300 | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B (Osteoprotegerin) | X |

| | | |
|---------------|--|---|
| Q9Y6Q6 | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A (RANK) | X |
| P14780 | Matrix Metalloproteinase-9 | X |
| P14780 | Matrix Metalloproteinase-9 | X |
| Q9NPA2 | Matrix metalloproteinase-25 | X |
| Q9NRE1 | Matrix metalloproteinase-26 | X |
| P22894 | Neutrophil collagenase (MMP8) | X |
| P22894 | Neutrophil collagenase (MMP8) | X |
| P22894 | Neutrophil collagenase (MMP8) | X |
| P43235 | Cathepsin K | X |
| P05186 | Alkaline phosphatase | X |
| P08246 | Neutrophil Elastase | X |
| P01023 | Alpha 2-macroglobulin | X |
| P02458 | Collagen alpha-1 (II) chain (C-telopeptide Pyridinoline) | X |
| Q13753 | Laminin subunit gamma 2 | X |
| P05164 | Myeloperoxidase | X |
| P35408 | Prostaglandin E2 | X |

À semelhança do que acontece noutros pontos anatómicos, é provável que ocorram glicosilações nestas proteínas na cavidade oral. Deste modo, justifica-se a realização de estudos futuros nesta área, pelos benefícios que este conhecimento trará para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares desta patologia.

MICROBIOMA ORAL DA PERIIMPLANTITE

Composição

De forma a perceber a existência de alterações do microbioma oral no paciente com periimplantite, foi realizada uma análise de estudos experimentais, com o objetivo de identificar os microrganismos aumentados na periimplantite face ao estado saudável.

A Tabela 3 indica os géneros dos microrganismos que se encontram aumentados nos tecidos do paciente portador de periimplantite face ao paciente saudável, provenientes da análise de resultados de estudos experimentais.

Tabela 3 – Géneros de microrganismos aumentados em periimplantite em relação ao estado saudável.

| NCBI Taxon ID | Nome do organismo | Regulação | Referência |
|---------------|-------------------|-----------|-----------------------------|
| 830 | Actinomyces | ↑ | Kumar PS <i>et all</i> 2012 |
| 2740 | Peptococcus | ↑ | Kumar PS <i>et all</i> 2012 |
| 194 | Campylobacter | ↑ | Kumar PS <i>et all</i> 2012 |
| 830 | Butyrivibrio | ↑ | Kumar PS <i>et all</i> 2012 |
| 1301 | Streptococcus | ↑ | Kumar PS <i>et all</i> 2012 |

Na tabela 3 foram incluídos os resultados de apenas um estudo experimental (46), no qual se descrevem os géneros aumentados em periimplantite, em relação ao estado saudável. A escassez de estudos analisados surge da ausência de estudos experimentais com as características necessárias para a identificação do microbioma oral da periimplantite. Os estudos disponíveis são estudos mais dirigidos para a deteção de microrganismos nos tecidos orais de pacientes com periodontite e periimplantite simultaneamente, ou estudos que estabelecem uma comparação do biofilme bacteriano em periimplantite com periodontite, não existindo um grupo de controlo, sem patologias periodontais.

As amostras deste estudo, que permitiu a identificação dos géneros aumentados em periimplantite em relação ao estado saudável, têm como origem as áreas subgingival e submucosa.

Este estudo foi a primeira exploração abrangente de comunidades microbianas em periimplantite e em redor de implantes saudáveis, revelando resultados surpreendentes do microbioma periimplantar, uma vez que os biofilmes periimplantares demonstraram uma menor diversidade do que aquilo que era esperado. Embora tenham sido detetados géneros altamente aumentados em relação ao estado de saúde, não foram detetados géneros exclusivos da periimplantite.

Assim, existe a necessidade de realizar mais estudos, de modo a poder definir o microbioma oral da periimplantite de forma mais específica, ou seja, descrever quais as espécies de microrganismos mais aumentadas em periimplantite, comparativamente ao saudável, pois a sua organização por géneros não permite determinar, com certeza, as implicações destes nesta patologia.

Após a identificação do microbioma oral da periimplantite foram identificadas as proteínas produzidas pelos microrganismos orais e estas foram separadas de acordo com a sua capacidade, ou não, de glicosilação (Figura 37).

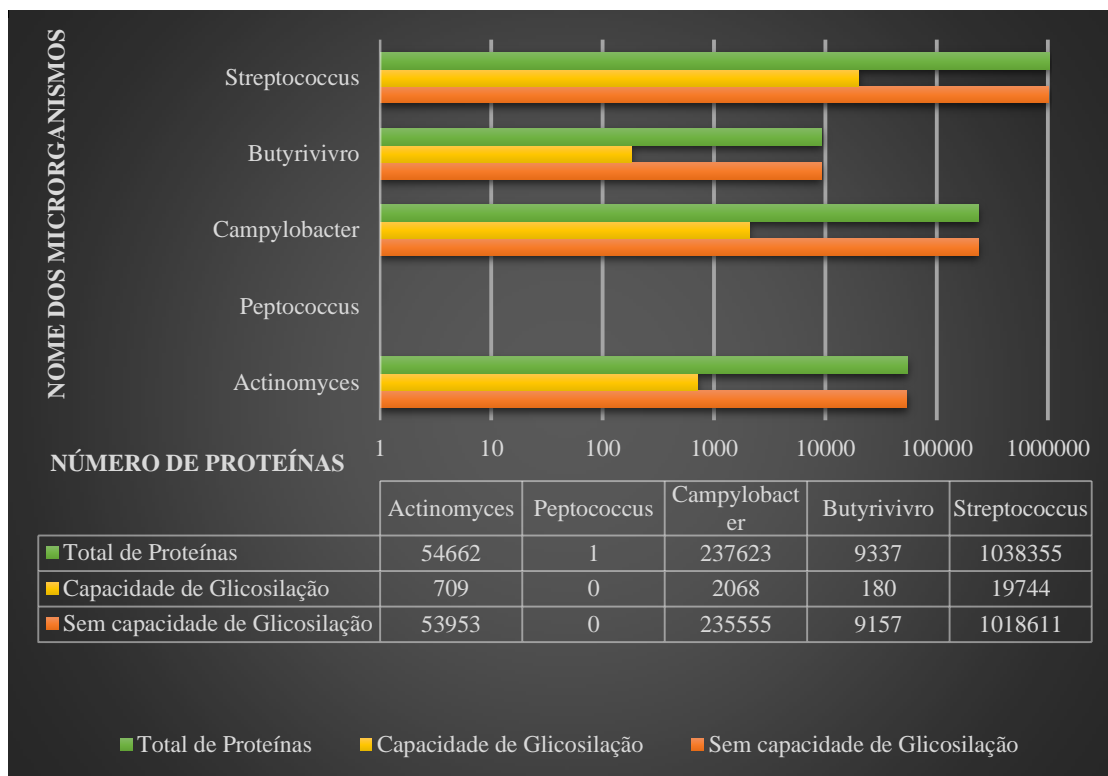


Figura 37 - Número de proteínas produzidas por cada género de microrganismo e a sua capacidade de glicosilação, identificadas nos estudos que identificaram o microbioma da periimplantite.

Da análise da Figura 37, é possível inferir que o género *Streptococcus* é o que maior número de proteínas produz, sendo também o género que apresenta maior número de proteínas com capacidade de glicosilação. O género *Peptococcus*, além de apresentar uma única proteína produzida, não revela qualquer proteína com capacidade de glicosilação.

Os valores elevados de proteínas com capacidade de glicosilação produzidas pelos microrganismos podem ser justificados pelo tipo de metabolismo que estes possuem.

Por sua vez, após a identificação das proteínas produzidas pelos microrganismos com capacidade de glicosilação, estas foram separadas de acordo com a sua capacidade de modificar açúcares (Figura 38)

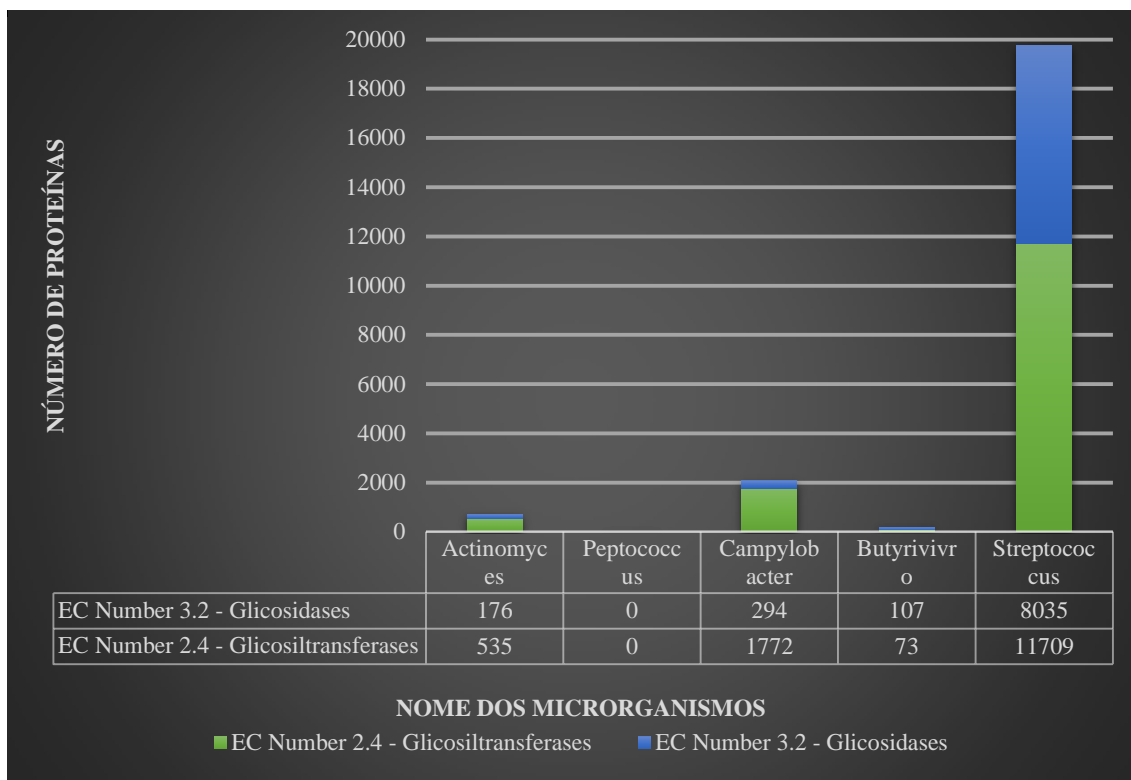


Figura 38 - Número de proteínas com *EC Number* 2.4 e 3.2 identificadas nos estudos que identificaram o microbioma da periimplantite.

Da análise da Figura 38, é possível inferir que os microrganismos identificados como aumentados na periimplantite apresentam uma maior produção de proteínas capazes de adicionar açúcares (glicosiltransferases (*EC Number* 2.4) do que remover açúcares (glicosidases (*EC Number* 3.2), com a exceção do género butyrivivrio que produz maior número de glicosidases.

INTERACTOMA HUMANO-MICROBIANO DA CAVIDADE ORAL NA PERIIMPLANTITE

A identificação do microbioma oral da periimplantite permitiu fazer o levantamento das interações que as proteínas microbianas estabelecem com as proteínas humanas, através do algoritmo OralInt. Recorreu-se à ferramenta de visualização Cytoscape para gerar as imagens correspondentes a essas interações. As figuras que se seguem demonstram as interações em detalhe, tendo sido realizadas por géneros microbianos.

A Figura 39 representa as interações das proteínas produzidas pelo género actinomyces.

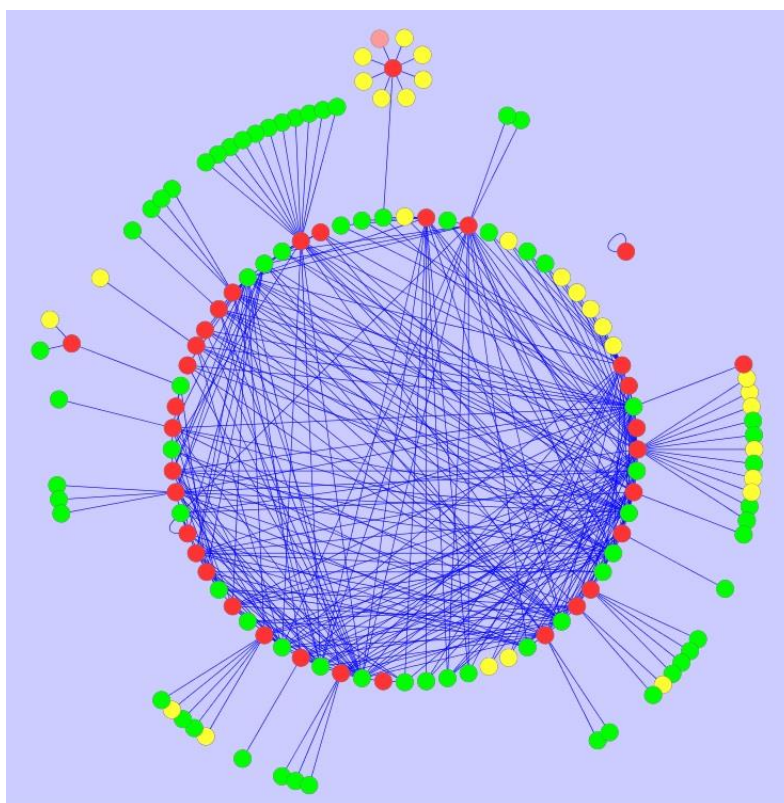


Figura 39 - Interações das proteínas bacterianas produzidas pelo género actinomyces da periimplantite (coloração a vermelho) com as proteínas humanas orais (coloração a verde), gerada através do algoritmo OralInt, cuja visualização foi realizada com recurso à ferramenta Cytoscape.

Na Figura 39, os pontos com coloração a vermelho, representam as proteínas produzidas pelos microrganismos de actinomyces que interagem com as proteínas orais humanas, com a coloração verde.

A análise da imagem, gerada pelo Cytoscape, permitiu identificar 2 proteínas produzidas pela actinomyces que poderão ter influência na atividade dos osteoclastos (Tabela 4).

Tabela 4 – Proteínas bacterianas do género actinomyces identificadas que interagem com proteínas orais humanas.

| Código UniProt KB | Nome da proteína | Organismo | Proteína com a qual interactua | Código UniProt KB | Organismo |
|-------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------|-------------------|--------------|
| A7B9A0 | Enolase | Actinomyces odontolyticus ATCC 17982 | Actin, cytoplasmatic 1 | P60709 | Homo sapiens |
| A7B922 | Glucose-1-phosphate thymidyltransferas | Actinomyces odontolyticus ATCC 17982 | Actin, cytoplasmatic 2 | P63261 | Homo sapiens |

A *actin* é uma proteína envolvida na via da reabsorção por parte dos osteoclastos. Esta vai ligar-se à *gelsolin* com PI3K, formando uma associação importante na formação de filamentos de actina em osteoclastos (Figura 36). Assim, estas proteínas bacterianas poderão induzir efeitos na *actin*, alterando a sua função.

A Figura 40 representa as interações das proteínas produzidas pelo género campylobacter.

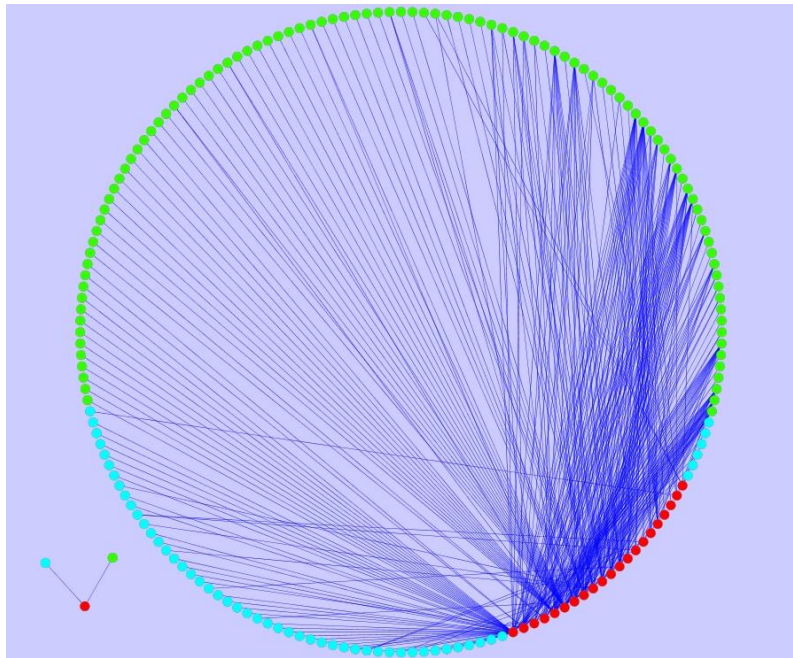


Figura 40 - Interações das proteínas bacterianas produzidas pelo género campylobacter da periimplantite (coloração a vermelho) com as proteínas humanas orais (coloração a verde), gerada através do algoritmo OralInt, cuja visualização foi realizada com recurso à ferramenta Cytoscape

Na Figura 40, os pontos a vermelho representam as proteínas orais produzidas pelos microrganismos do género campylobacter que interagem com as proteínas orais humanas, com coloração a verde.

A análise da imagem, gerada pelo Cytoscape, permitiu identificar uma proteína produzida por campylobacter que interage com uma proteína oral na periimplantite e algumas proteínas produzidas por campylobacter que poderão ter influência nas vias de diferenciação, ativação ou indução dos osteoclastos (Tabela 5).

Tabela 5 – Proteínas bacterianas do género campylobacter identificadas que interagem com proteínas orais humanas.

| Código UniProt KB | Nome da proteína | Organismo | Proteína com a qual interactua | Código UniProt KB | Organismo |
|-------------------|--|-------------------------------|------------------------------------|-------------------|--------------|
| A7ZD60 | Superoxide dismutase | Campylobacter concisus | Mitogen-activated protein kinase 6 | Q16659 | Homo sapiens |
| C8PK42 | Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase | Campylobacter gracilis RM3268 | Mitogen-activated protein kinase 6 | Q16659 | Homo sapiens |

| | | | | | |
|--------|--|----------------------------------|------------------------------------|--------|--------------|
| C8PK88 | Elongation factor Tu | Campylobacter gracilis RM3268 | Actin | P60709 | Homo sapiens |
| A0RQ16 | Serine hydroxymethyl transferase | Campylobacter fetus subsp. fetus | Actin | P60709 | Homo sapiens |
| C8PK42 | Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase | Campylobacter gracilis RM3268 | Mitogen-activated protein kinase 3 | P27361 | Homo sapiens |
| A7H0G1 | Glutamate-tRNA ligase 2 | Campylobacter curvus | Arginase | P05089 | Homo sapiens |

Pela análise da Tabela 5 é possível verificar que uma proteína produzida por *campylobacter curvus*, a *Glutamate-tRNA ligase 2*, interage com a arginase. As restantes proteínas bacterianas identificadas interagem com proteínas das vias das MAPKs. Sabendo que esta via se encontra relacionada com a diferenciação dos osteoclastos, como referido anteriormente, é possível que estas proteínas bacterianas identificadas possam induzir algum tipo de modificação, levando a uma alteração na via de diferenciação dos osteoclastos.

A Figura 41 representa as interações das proteínas produzidas pelo género streptococcus.

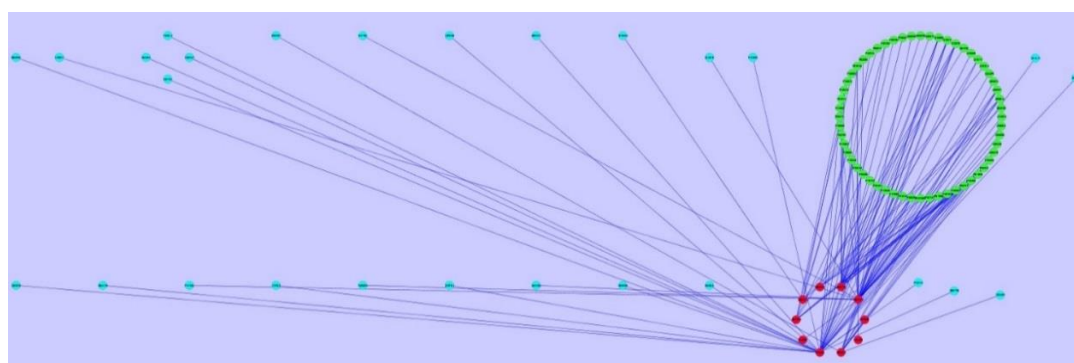


Figura 41 - Interações das proteínas bacterianas produzidas pelo género streptococcus da periimplantite (coloração a vermelho) com as proteínas humanas orais (coloração a verde), gerada através do algoritmo OralInt, cuja visualização foi realizada com recurso à ferramenta Cytoscape

Na Figura 41, os pontos a vermelho representam as proteínas orais produzidas pelos microrganismos da streptococcus que interagem com as proteínas orais humanas, com coloração a verde.

Pela análise da Figura 41, gerada pelo Cytoscape, não se identificaram proteínas produzidas por este género que aparentemente tivessem significância para o estudo em questão.

Relativamente aos géneros *butyrivibrio* e *peptococcus*, devido à inexistência de dados não foi possível gerar as respetivas imagens.

ENZIMAS COM ATIVIDADE GLICOSÍDICA PRODUZIDAS PELOS MICRORGANISMOS

Após a análise das Figuras 39, 40 e 41, anotaram-se as proteínas bacterianas orais com capacidade glicosídica e que interagem com as proteínas orais humanas (Tabela 6).

Tabela 6 – Proteínas bacterianas orais com capacidade glicosídica.

| Código UniProt KB | Nome da proteína | Organismo | EC Number |
|-------------------|--|---------------|-----------|
| A7BEJ4 | Phosphorylase | Actinomyces | 2.4.1.1 |
| A7BDN0 | 1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB | Actinomyces | 2.4.1.18 |
| Q8DTV2 | Orotate phosphoribosyltransferase | Streptococcus | 2.4.2.10 |

A análise da Tabela 6 indica que existem apenas 3 proteínas produzidas pelos microrganismos que interagem com proteínas orais humanas, que sejam capazes de modificar o estado de glicosilação.

Mais estudos ao nível da microbiologia da periimplantite são necessários, de forma a compreender o efeito do microbioma na evolução da patologia. Assim, poder-se-á atuar de forma preventiva ao nível da bacteriologia, uma vez que esta parece desencadear as patologias periimplantares.

TRATAMENTO DA PERIIMPLANTITE

O uso da talidomida tem gerado controvérsia no meio académico ao longo da história (99).

A talidomida tem sido utilizada, recentemente, em terapias de alguns tumores malignos pelas suas propriedades anti-inflamatórias e anti-angiogénicas (100).

Um estudo revela que a talidomida inibe a produção de TNF- α pelos monócitos presentes no sangue humano, sem influenciar a síntese de outras proteínas e a expressão de três citocinas derivadas dos monócitos (99)

O facto de a TNF- α induzir a apoptose dos osteoblastos e ser um dos estímulos para as MAPKs, sendo assim uma proteína que está diretamente relacionada com a desregulação do metabolismo ósseo levando à perda de osso em redor do implante, leva a sugerir uma possível aplicação da talidomida no tratamento da periimplantite. Apesar de ser um fármaco com efeitos teratogénicos (semelhantes a outros que se encontram no mercado para aplicação em dermatologia), a sua utilização local em concentrações mínimas, coadjuvado com outros tratamentos clínicos pode, possivelmente, contribuir para uma redução e controlo da perda óssea em periimplantite. Deste modo, justifica-se a realização de estudos experimentais para o estabelecimento dos riscos/benefícios da utilização deste fármaco na periimplantite.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi efetuada uma análise de resultados de estudos dirigidos que identificaram proteínas presentes na periimplantite, com amostras obtidas de indivíduos com esta patologia, sendo realizada uma anotação manual de informações consideradas essenciais para a interpretação dos dados catalogados. Esta pesquisa e anotação permitiu atualizar a base de dados do OralCard, compilando pela primeira vez informação relativamente à periimplantite nesta base de dados.

A caracterização funcional do OralOma da periimplantite permitiu inferir uma relação entre o processo de apoptose e a periimplantite, uma vez que na periimplantite existe um aumento estatisticamente significativo, $p\text{-value} < 0.05$, verificado na via da apoptose, e um aumento estatisticamente significativo, $p\text{-value} < 0.01$, verificado no processo biológico “*apoptosis*”.

Com o estabelecimento da rede de PPIs verificou-se a presença de algumas proteínas em processos biológicos e vias de sinalização que têm repercussões ao nível dos osteoblastos e osteoclastos. Foi possível relacionar o aumento da concentração da TNF- α na periimplantite com a apoptose dos osteoblastos, e o aumento da concentração da RANK e RANKL na periimplantite com as vias de diferenciação e sobrevivência dos osteoclastos.

Com este trabalho, é possível sugerir que a perda óssea que caracteriza a periimplantite se deve à perda dos osteoblastos por processos apoptóticos, resultante do aumento da concentração de TNF- α e também pelo aumento da concentração da RANK e RANKL, também aumentadas em periimplantite, que vão estimular a diferenciação e sobrevivência dos osteoclastos. Assim, com a diminuição dos osteoblastos e o aumento dos osteoclastos, a perda do osso em redor do implante torna-se inevitável.

Relativamente ao microbioma da periimplantite, concluiu-se que existe uma grande escassez de estudos experimentais com características necessárias para a sua identificação. Contudo, foram anotados os géneros aumentados em periimplantite face ao estado saudável.

Da identificação dos géneros de microrganismos aumentados em periimplantite, foi possível verificar os que produziam maior número de proteínas capazes de glicosilar/desglicosilar proteínas. Concluiu-se que o género *Streptococcus* é o que produz não só o maior número de proteínas bacterianas, mas também o maior número de proteínas bacterianas capazes de glicosilar/desglicosilar outras proteínas.

Da análise do interactoma humano-microbiano, foi possível concluir que ainda existe uma escassez de dados que permita traçar uma rede de interações da qual se consiga extrair dados que se possam relacionar com a periimplantite.

Ainda assim, foram geradas as redes de interações para 3 géneros de microrganismos identificados como aumentados na periimplantite, tendo o género *Campylobacter* mostrado que pode influenciar as vias de diferenciação dos osteoclastos.

Para além disso, como resultado da análise do interactoma, foram anotadas as proteínas bacterianas orais com capacidade de modificação do estado de glicosilação que interagem com as proteínas orais humanas, verificando-se um número muito baixo de proteínas com essa capacidade.

Concluiu-se que são necessários mais estudos ao nível da microbiologia da periimplantite, de forma a compreender o efeito do microbioma na evolução desta patologia. Assim, poder-se-ão traçar metodologias preventivas de forma a atuar sobre os microrganismos, uma vez que estes parecem desencadear as patologias periimplantares.

Em suma, podemos estar perante uma nova redefinição de periimplantite, pela qual esta doença, de grande impacto económico e na saúde oral dos pacientes, consiste numa reação inflamatória com consequente perda de suporte ósseo ao redor do implante dentário, mediada por processos apoptóticos.

BIBLIOGRAFIA

1. Karring T, Cumming BR, Oliver RC, Loe H. The origin of granulation tissue and its impact on postoperative results of mucogingival surgery. *J Periodontol.* 1975 Oct;46(10):577-85.
2. Gould TR, Westbury L, Brunette DM. Ultrastructural study of the attachment of human gingiva to titanium in vivo. *J Prosthet Dent.* 1984 Sep;52(3):418-20.
3. Carmichael RP, McCulloch CA, Zarb GA. Quantitative immunohistochemical analysis of keratins and desmoplakins in human gingiva and peri-implant mucosa. *J Dent Res.* 1991 May;70(5):899-905.
4. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res.* 1991 Apr-Jun;2(2):81-90.
5. Ruggeri A, Franchi M, Marini N, Trisi P, Piatelli A. Supracrestal circular collagen fiber network around osseointegrated nonsubmerged titanium implants. *Clin Oral Implants Res.* 1992 Dec;3(4):169-75.
6. Berglundh T, Lindhe J, Jonsson K, Ericsson I. The topography of the vascular systems in the periodontal and peri-implant tissues in the dog. *J Clin Periodontol.* 1994 Mar;21(3):189-93.
7. Albrektsson T, Sennerby L, Wennerberg A. State of the art of oral implants. *Periodontol* 2000. 2008;47:15-26.
8. Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, *et al.* Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1977;16:1-132.
9. Branemark R, Branemark PI, Rydevik B, Myers RR. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. *J Rehabil Res Dev.* 2001 Mar-Apr;38(2):175-81.
10. Aschi Chug SS, Lanka Mahesh, Sanjay Jadwani. Osseointegration - Molecular events at the bone - implant interface: A review. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology.* In press. 2012.
11. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2009 Mar;2(1):56-64.
12. Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci.* 2008;13:898-903.

13. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*. 1999 Dec;20(23-24):2311-21.
14. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng*. 2005 Jan-Feb;11(1-2):1-18.
15. Cooper LF. Biologic determinants of bone formation for osseointegration: clues for future clinical improvements. *J Prosthet Dent*. 1998 Oct;80(4):439-49.
16. Sastry SK, Burrige K. Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp Cell Res*. 2000 Nov 25;261(1):25-36.
17. Colnot C, Romero DM, Huang S, Rahman J, Currey JA, Nanci A, *et al*. Molecular analysis of healing at a bone-implant interface. *J Dent Res*. 2007 Sep;86(9):862-7.
18. Buchter A, Joos U, Wiesmann HP, Seper L, Meyer U. Biological and biomechanical evaluation of interface reaction at conical screw-type implants. *Head Face Med*. 2006;2:5.
19. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ*. 2003 Aug;67(8):932-49.
20. Schwartz Z, Martin Jy, Dean DD, Simpson J, Cochran DL, Boyan BD. Effects of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production and differentiation depends on the state of cell maturation. *J Biomed Mater Res*. 1996;30:145-55
21. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 1998 Jun;17:63-76.
22. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci*. 1998 Jun;106(3):721-64.
23. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):286-91.
24. Yamada S, Sekiya S, Yamanouchi K, Kitamura H, Ohshima M, Sato T. Evaluation of the peri-implant membrane induced around ceramic dental implants in dogs: a transmission electron microscopic study. *Bull Tokyo Dent Coll*. 1989 Nov;30(4):187-93.
25. Apse P, Zarb GA, Schmitt A, Lewis DW. The longitudinal effectiveness of osseointegrated dental implants. The Toronto Study: peri-implant mucosal response. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1991;11(2):94-111.

26. Mombelli A, Lang NP. Clinical parameters for the evaluation of dental implants. *Periodontol* 2000. 1994 Feb;4:81-6.
27. Salvi GE, Lang NP. Diagnostic parameters for monitoring peri-implant conditions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004;19 Suppl:116-27.
28. Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res*. 2002 Feb;13(1):1-19.
29. Heitz-Mayfield LJ. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):292-304.
30. Hammerle CH, Glauser R. Clinical evaluation of dental implant treatment. *Periodontol* 2000. 2004;34:230-9.
31. Mombelli A, Marxer M, Gaberthuel T, Grunder U, Lang NP. The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1995 Feb;22(2):124-30.
32. Ellegaard B, Baelum V, Karring T. Implant therapy in periodontally compromised patients. *Clin Oral Implants Res*. 1997 Jun;8(3):180-8.
33. Sham AS, Cheung LK, Jin LJ, Corbet EF. The effects of tobacco use on oral health. *Hong Kong Med J*. 2003 Aug;9(4):271-7.
34. Rodriguez-Argueta OF, Figueiredo R, Valmaseda-Castellon E, Gay-Escoda C. Postoperative complications in smoking patients treated with implants: a retrospective study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Aug;69(8):2152-7.
35. Ferreira SD, Silva GL, Cortelli JR, Costa JE, Costa FO. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *J Clin Periodontol*. 2006 Dec;33(12):929-35.
36. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci*. 1998 Feb;106(1):527-51.
37. Rangert B, Jemt T, Jorneus L. Forces and moments on Branemark implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989 Fall;4(3):241-7.
38. Rangert B, Krogh PH, Langer B, Van Roekel N. Bending overload and implant fracture: a retrospective clinical analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995 May-Jun;10(3):326-34.
39. Haas R, Haimbock W, Mailath G, Watzek G. The relationship of smoking on peri-implant tissue: a retrospective study. *J Prosthet Dent*. 1996 Dec;76(6):592-6.

40. Xing L, Schwarz EM, Boyce BF. Osteoclast precursors, RANKL/RANK, and immunology. *Immunol Rev.* 2005 Dec;208:19-29.
41. Choi BK, Lee HJ, Kang JH, Jeong GJ, Min CK, Yoo YJ. Induction of osteoclastogenesis and matrix metalloproteinase expression by the lipooligosaccharide of *Treponema denticola*. *Infect Immun.* 2003 Jan;71(1):226-33.
42. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000 Jan;15(1):2-12.
43. Le XK, Laflamme C, Rouabhia M. *Porphyromonas gingivalis* decreases osteoblast proliferation through IL-6-RANKL/OPG and MMP-9/TIMPs pathways. *Indian J Dent Res.* 2009 Apr-Jun;20(2):141-9.
44. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013 Mar;69(1):137-43.
45. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, *et al.* The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010 Oct;192(19):5002-17.
46. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol.* 2012 May;39(5):425-33.
47. Adriana Moreira da Silva e Silva GCC, Emerson Moreira Reis Proteomica - uma abordagem funcional do estudo do genoma. *Saúde e Ambiente em Revista.* 2007;2(2):1-10.
48. Arrais JP, Rosa N, Melo J, Coelho ED, Amaral D, Correia MJ, *et al.* OralCard: a bioinformatic tool for the study of oral proteome. *Arch Oral Biol.* 2013 Jul;58(7):762-72.
49. Rosa N, Correia MJ, Arrais JP, Lopes P, Melo J, Oliveira JL, *et al.* From the salivary proteome to the OralOme: comprehensive molecular oral biology. *Arch Oral Biol.* 2012 Jul;57(7):853-64.
50. Edgar D, Coelho JPA, Sérgio Matos, Carlos Pereira, Nuno Rosa, Maria José Correia, Marlene Barros, José Luís Oliveira. Computational Prediction of the Human-Microbial Oral Interactome. 2013.
51. Sung J, Wang Y, Chandrasekaran S, Witten DM, Price ND. Molecular signatures from omics data: from chaos to consensus. *Biotechnol J.* 2012 Aug;7(8):946-57.

52. Gesslbauer B, Theuer M, Schweiger D, Adage T, Kungl AJ. New targets for glycosaminoglycans and glycosaminoglycans as novel targets. *Expert Rev Proteomics*. 2013 Feb;10(1):77-95.
53. C. W. Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory. Englewood, Colo. 2006.
54. Wilhelm von der Lieth Claus LT FM. *Bioinformatics for Glycobiology and Glycomics*. 2009.
55. Rudd PM, Dwek RA. Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1997;32(1):1-100.
56. Petrescu S. Glycosilation. InTech. 2012.
57. Quintero DG, Winger JN, Khashaba R, Borke JL. Advanced glycation endproducts and rat dental implant osseointegration. *J Oral Implantol*. 2010;36(2):97-103.
58. Mi H, Muruganujan A, Thomas PD. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue):D377-86.
59. Mi H, Guo N, Kejariwal A, Thomas PD. PANTHER version 6: protein sequence and function evolution data with expanded representation of biological pathways. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jan;35(Database issue):D247-52.
60. Cho RJ, Campbell MJ. Transcription, genomes, function. *Trends Genet*. 2000 Sep;16(9):409-15.
61. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, *et al*. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue):D808-15.
62. UniProt C. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue):D43-7.
63. Schomburg I, Chang A, Placzek S, Sohngen C, Rother M, Lang M, *et al*. BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue):D764-72.
64. Severino VO, Napimoga MH, de Lima Pereira SA. Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-8 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Arch Oral Biol*. 2011 Aug;56(8):823-8.

65. Duarte PM, de Mendonca AC, Maximo MB, Santos VR, Bastos MF, Nociti Junior FH. Differential cytokine expressions affect the severity of peri-implant disease. *Clin Oral Implants Res.* 2009 May;20(5):514-20.
66. Laine ML, Leonhardt A, Roos-Jansaker AM, Pena AS, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, *et al.* IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Aug;17(4):380-5.
67. Ma J, Kitti U, Hanemaaijer R, Teronen OP, Sorsa TA, Natah S, *et al.* Gelatinase B is associated with peri-implant bone loss. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Dec;14(6):709-13.
68. Tumer C, Aksoy Y, Guncu GN, Nohutcu RM, Kilinc K, Tozum TF. Possible impact of inflammatory status on C-telopeptide pyridinoline cross-links of type I collagen and osteocalcin levels around oral implants with peri-implantitis: a controlled clinical trial. *J Oral Rehabil.* 2008 Dec;35(12):934-9.
69. Murata M, Tatsumi J, Kato Y, Suda S, Nunokawa Y, Kobayashi Y, *et al.* Osteocalcin, deoxypyridinoline and interleukin-1beta in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Dec;13(6):637-43.
70. Rakic M, Lekovic V, Nikolic-Jakoba N, Vojvodic D, Petkovic-Curcin A, Sanz M. Bone loss biomarkers associated with peri-implantitis. A cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Jun 18.
71. Luo Z, Wang H, Sun Z, Luo W, Wu Y. Expression of IL-22, IL-22R and IL-23 in the peri-implant soft tissues of patients with peri-implantitis. *Arch Oral Biol.* 2013 May;58(5):523-9.
72. Kuula H, Salo T, Pirila E, Hagstrom J, Luomanen M, Gutierrez-Fernandez A, *et al.* Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Arch Oral Biol.* 2008 Feb;53(2):175-86.
73. Arakawa H, Uehara J, Hara ES, Sonoyama W, Kimura A, Kanyama M, *et al.* Matrix metalloproteinase-8 is the major potential collagenase in active peri-implantitis. *J Prosthodont Res.* 2012 Oct;56(4):249-55.
74. Kivela-Rajamaki MJ, Teronen OP, Maisi P, Husa V, Tervahartiala TI, Pirila EM, *et al.* Laminin-5 gamma2-chain and collagenase-2 (MMP-8) in human peri-implant sulcular fluid. *Clin Oral Implants Res.* 2003 Apr;14(2):158-65.
75. Kivela-Rajamaki M, Maisi P, Srinivas R, Tervahartiala T, Teronen O, Husa V, *et al.* Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-8 (collagenase-2) in diseased human peri-implant sulcular fluid. *J Periodontal Res.* 2003 Dec;38(6):583-90.

76. Strbac GD, Monov G, Cei S, Kandler B, Watzek G, Gruber R. Cathepsin K levels in the crevicular fluid of dental implants: a pilot study. *J Clin Periodontol*. 2006 Apr;33(4):302-8.
77. Petkovic AB, Matic SM, Stamatovic NV, Vojvodic DV, Todorovic TM, Lazic ZR, *et al*. Proinflammatory cytokines (IL-1beta and TNF-alpha) and chemokines (IL-8 and MIP-1alpha) as markers of peri-implant tissue condition. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010 May;39(5):478-85.
78. Luo L, Xie P, Gong P, Tang XH, Ding Y, Deng LX. Expression of HMGB1 and HMG2 in gingival tissues, GCF and PICF of periodontitis patients and peri-implantitis. *Arch Oral Biol*. 2011 Oct;56(10):1106-11.
79. Plagnat D, Giannopoulou C, Carrel A, Bernard JP, Mombelli A, Belser UC. Elastase, alpha2-macroglobulin and alkaline phosphatase in crevicular fluid from implants with and without periimplantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2002 Jun;13(3):227-33.
80. Ozcakir-Tomruk C, Chiquet M, Mericske-Stern R. Tenascin-C and matrix metalloproteinase-9 levels in crevicular fluid of teeth and implants. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012 Oct;14(5):672-81.
81. Liskmann S, Zilmer M, Vihalemm T, Salum O, Fischer K. Correlation of peri-implant health and myeloperoxidase levels: a cross-sectional clinical study. *Clin Oral Implants Res*. 2004 Oct;15(5):546-52.
82. Queiroz DA, Cortelli JR, Holzhausen M, Rodrigues E, Aquino DR, Saad WA. Smoking increases salivary arginase activity in patients with dental implants. *Clin Oral Investig*. 2009 Sep;13(3):263-7.
83. Basegmez C, Yalcin S, Yalcin F, Ersanli S, Mijiritsky E. Evaluation of periimplant crevicular fluid prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-8 levels from health to periimplant disease status: a prospective study. *Implant Dent*. 2012 Aug;21(4):306-10.
84. Nauseef WM, Olsson I, Arnljots K. Biosynthesis and processing of myeloperoxidase--a marker for myeloid cell differentiation. *Eur J Haematol*. 1988 Feb;40(2):97-110.
85. Nagase H, Karamanos N. Metalloproteinases in health and disease: challenges and the future prospects. *FEBS J*. 2011 Jan;278(1):1.
86. Collin HL, Sorsa T, Meurman JH, Niskanen L, Salo T, Ronka H, *et al*. Salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) levels and gelatinase (MMP-9) activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontal Res*. 2000 Oct;35(5):259-65.

87. Gyurko R, Boustany G, Huang PL, Kantarci A, Van Dyke TE, Genco CA, *et al.* Mice lacking inducible nitric oxide synthase demonstrate impaired killing of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 2003 Sep;71(9):4917-24.
88. Fleissig Y, Reichenberg E, Redlich M, Zaks B, Deutsch O, Aframian DJ, *et al.* Comparative proteomic analysis of human oral fluids according to gender and age. *Oral Dis.* 2010 Nov;16(8):831-8.
89. Bebek G, Koyuturk M, Price ND, Chance MR. Network biology methods integrating biological data for translational science. *Brief Bioinform.* 2012 Jul;13(4):446-59.
90. Dong J, Cui X, Jiang Z, Sun J. MicroRNA-23a modulates tumor necrosis factor-alpha-induced osteoblasts apoptosis by directly targeting Fas. *J Cell Biochem.* 2013 Jun 26.
91. Carlson J, Cui W, Zhang Q, Xu X, Mercan F, Bennett AM, *et al.* Role of MKP-1 in osteoclasts and bone homeostasis. *Am J Pathol.* 2009 Oct;175(4):1564-73.
92. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene.* 2004 Apr 12;23(16):2838-49.
93. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:795-823.
94. Galibert L, Tometsko ME, Anderson DM, Cosman D, Dougall WC. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem.* 1998 Dec 18;273(51):34120-7.
95. Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, *et al.* Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol.* 1999 Jul 1;163(1):434-42.
96. Kashiwada M, Shirakata Y, Inoue JI, Nakano H, Okazaki K, Okumura K, *et al.* Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity in CD40 signaling along a ras-independent pathway. *J Exp Med.* 1998 Jan 19;187(2):237-44.
97. Mansky KC, Sankar U, Han J, Ostrowski MC. Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling. *J Biol Chem.* 2002 Mar 29;277(13):11077-83.
98. Chellaiah M, Fitzgerald C, Alvarez U, Hruska K. c-Src is required for stimulation of gelsolin-associated phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 1998 May 8;273(19):11908-16.

99. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med.* 1991 Mar 1;173(3):699-703.

100. Zhang S, Li M, Gu Y, Liu Z, Xu S, Cui Y, et al. Thalidomide influences growth and vasculogenic mimicry channel formation in melanoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008;27:60.

ANEXOS

| UniProtKB AC | Name | Whole Saliva | Crevicular Fluid | Mucosa | Health | Disease (MeSH ID) | Regulation | Age group | Gender | Social Habits | Methods of Sampling | Methods of Analysis | Type of Study | Biomarker | Citation (NCBI ID) |
|--------------|---|--------------|------------------|--------|--------|-------------------|------------|-----------|--------|-------------------------|---|--|----------------|-----------|--------------------|
| P18510 | Interleukin-1 receptor antagonist protein | x | | | x | 68057873 | + | 32-88 | M/F | Smoking and non-smoking | clinical healthy mucosa and no bone loss around the implants were recruited for the study | The bi-allelic polymorphisms at position_889 within the promoter region of the IL-1A gene (McDowell et al. 1995), at position b3954 (TaqI restriction fragment length polymorphism) within exon 5 (Bioque et al. 1995) and at position_511 within the promoter region of the IL-1B gene (di Giovine et al. 1992), and the penta-allelic variable number of the tandem repeat polymorphism within the second intron of the IL-1RN gene were determined according to previously described methods (Mansfield et al. 1994). | Non-proteomics | | 16907768 |
| P01583 | Interleukin-1 Alpha | x | | | x | 68057873 | + | 32-88 | M/F | Smoking and non-smoking | clinical healthy mucosa and no bone loss around the implants were recruited for the study | The bi-allelic polymorphisms at position_889 within the promoter region of the IL-1A gene (McDowell et al. 1995), at position b3954 (TaqI restriction fragment length polymorphism) within exon 5 (Bioque et al. 1995) and at position_511 within the promoter region of the IL-1B gene (di Giovine et al. 1992), and the penta-allelic variable number of the tandem repeat polymorphism within the second intron of the IL-1RN gene were determined according to previously described methods (Mansfield et al. 1994). | Non-proteomics | | 16907768 |
| P01584 | Interleukin-1 Beta | x | | | x | 68057873 | + | 32-88 | M/F | Smoking and non-smoking | clinical healthy mucosa and no bone loss around the implants were recruited for the study | The bi-allelic polymorphisms at position_889 within the promoter region of the IL-1A gene (McDowell et al. 1995), at position b3954 (TaqI restriction fragment length polymorphism) within exon 5 (Bioque et al. 1995) and at position_511 within the promoter region of the IL-1B gene (di Giovine et al. 1992), and the penta-allelic variable number of the tandem repeat polymorphism within the second intron of the IL-1RN gene were determined according to previously described methods (Mansfield et al. 1994). | Non-proteomics | | 16907768 |
| P05112 | Interleukin-4 | | | x | x | 68057873 | - | | M/F | Non- Smoking | Peri-implant soft tissue biopsies (n=48) were harvested from healthy implant (HI), mucositis (MC), initial peri-implantitis (IP) and severe peri-implantitis (SP) sites. | The RNA concentration was determined from the optical density using the Biophotometer | Non-proteomics | | 19302394 |
| P05231 | Interleukin-6 | | x | | x | 68057873 | + | Adults | M/F | Non-smoking | The PCF was collected from 40 implants regarding 25 patients, being 14 patients with PP and 11 HP totalizing 20 implants from each group. The PCF samples collected from each patient were quantified for IL-6, IL-17, IL-8 and IL-10 using the enzymatic immunosorbent assay | The PCF samples were centrifuged at 5000 g for 15 min at 4 °C. Aliquots of each GCF sample were assayed by enzymatic immunosorbent assay (ELISA) to determine the levels of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-8, according to the manufacturer's recommendations | Non-proteomics | | 21306703 |
| P10145 | Interleukin-8 | | x | x | x | 68057873 | + | 25-68 | M/F | Non-smoking | The PCF was collected from 40 implants regarding 25 patients, being 14 patients with PP and 11 HP totalizing 20 implants from each group. The PCF samples collected from each patient were quantified for IL-6, IL-17, IL-8 and IL-10 using the enzymatic immunosorbent assay | The PCF samples were centrifuged at 5000 g for 15 min at 4 °C. Aliquots of each GCF sample were assayed by enzymatic immunosorbent assay (ELISA) to determine the levels of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-8, according to the manufacturer's recommendations | Non-proteomics | | 21306703 |
| P22301 | Interleukin-10 | | | x | x | 68057873 | + | | M/F | Non-smoking | Peri-implant soft tissue biopsies (n=48) were harvested from healthy implant (HI), mucositis (MC), initial peri-implantitis (IP) and severe peri-implantitis (SP) sites. | The RNA concentration was determined from the optical density using the Biophotometer | Non-proteomics | | 19302394 |
| O60595 | Interleukin-12 | | | x | x | 68057873 | + | | M/F | Non-smoking | Peri-implant soft tissue biopsies (n=48) were harvested from healthy implant (HI), mucositis (MC), initial peri-implantitis (IP) and severe peri-implantitis (SP) sites. | The RNA concentration was determined from the optical density using the Biophotometer | Non-proteomics | | 19302394 |
| Q5QEX9 | Interleukin-17 | | x | | x | 68057873 | + | Adults | M/F | Non-smoking | The PCF was collected from 40 implants regarding 25 patients, being 14 patients with PP and 11 HP totalizing 20 implants from each group. The PCF samples collected from each patient were quantified for IL-6, IL-17, IL-8 and IL-10 using the enzymatic immunosorbent assay | The PCF samples were centrifuged at 5000 g for 15 min at 4 °C. Aliquots of each GCF sample were assayed by enzymatic immunosorbent assay (ELISA) to determine the levels of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-8, according to the manufacturer's recommendations | Non-proteomics | | 21306703 |
| Q9GZX6 | Interleukin 22 | | | x | x | 68057873 | + | | M/F | | Peri-implant soft tissues were collected from 12 adults with peri-implantitis during the time of peri-implant surgery or the extraction of severely involved implants. | Immunohistochemistry (IHC) and real-time quantitative PCR (qPCR) were performed to analyse the gene expression of IL-22, IL-22R and IL-23p19 in peri-implant soft tissues in the PG and the HG group. | Non-proteomics | | 23058849 |
| Q8N6P7 | Interleukin 22 receptor | | | x | x | 68057873 | + | | M/F | | Peri-implant soft tissues were collected from 12 adults with peri-implantitis during the time of peri-implant surgery or the extraction of severely involved implants. | Immunohistochemistry (IHC) and real-time quantitative PCR (qPCR) were performed to analyse the gene expression of IL-22, IL-22R and IL-23p19 in peri-implant soft tissues in the PG and the HG group. | Non-proteomics | | 23058849 |
| Q9NPF7 | Interleukin 23 | | | x | x | 68057873 | + | | M/F | | Peri-implant soft tissues were collected from 12 adults with peri-implantitis during the time of peri-implant surgery or the extraction of severely involved implants. | Immunohistochemistry (IHC) and real-time quantitative PCR (qPCR) were performed to analyse the gene expression of IL-22, IL-22R and IL-23p19 in peri-implant soft tissues in the PG and the HG group. | Non-proteomics | | 23058849 |
| O14788 | Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11 (RANKL) | | | x | x | 68057873 | + | | M/F | Non-smoking | Peri-implant soft tissue biopsies (n=48) were harvested from healthy implant (HI), mucositis (MC), initial peri-implantitis (IP) and severe peri-implantitis (SP) sites. | The RNA concentration was determined from the optical density using the Biophotometer | Non-proteomics | | 19302394 |
| O00300 | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B (Osteoprotegerin) | | | x | x | 68057873 | - | | M/F | Non-smoking | Peri-implant soft tissue biopsies (n=48) were harvested from healthy implant (HI), mucositis (MC), initial peri-implantitis (IP) and severe peri-implantitis (SP) sites. | The RNA concentration was determined from the optical density using the Biophotometer | Non-proteomics | | 19302394 |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|---|--|---|---|----------|-----|-------|-----|-------------------------|---|--|----------------|---|----------|
| P01375 | Tumor factor necrosis (TNF-Alpha) | | x | x | 68057873 | + | | M/F | Non-smoking | Peri-implant soft tissue biopsies (n=48) were harvested from healthy implant (HI), mucositis (MC), initial peri-implantitis (IP) and severe peri-implantitis (SP) sites. | The RNA concentration was determined from the optical density using the Biophotometer | Non-proteomics | | 19302394 |
| O14788 | Tumor Necrosis factor ligand superfamily member 11 (RANKL) | | x | x | 68057873 | 1,8 | 23-60 | M/F | Non-smoking | The samples were retrieved using the filter paper technique (Petkovic et al. 2010). In brief, the sampling site was isolated, airdried, and isolated with cotton rolls, the supra-gingival biofilm was gently removed and then a fine sterile paper strip (Periopaper, Pro Flow, Amityville, NY, USA) was inserted into the peri-implant/periodontal sulcus/pocket until mild resistance was felt and left in place for 30 s. | The concentrations of RANKL, RANK and OPG were evaluated using enzyme-linked immunosorbent assays; they were compared between the groups and correlated with the clinical findings. | Non-proteomics | | 22708989 |
| O00300 | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B (Osteoprotegerin) | | x | x | 68057873 | 1,2 | 23-60 | M/F | Non-smoking | The samples were retrieved using the filter paper technique (Petkovic et al. 2010). In brief, the sampling site was isolated, airdried, and isolated with cotton rolls, the supra-gingival biofilm was gently removed and then a fine sterile paper strip (Periopaper, Pro Flow, Amityville, NY, USA) was inserted into the peri-implant/periodontal sulcus/pocket until mild resistance was felt and left in place for 30 s. | The concentrations of RANKL, RANK and OPG were evaluated using enzyme-linked immunosorbent assays; they were compared between the groups and correlated with the clinical findings. | Non-proteomics | | 22708989 |
| Q9Y6Q6 | Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A (RANK) | | x | x | 68057873 | 2,7 | 23-60 | M/F | Non-smoking | The samples were retrieved using the filter paper technique (Petkovic et al. 2010). In brief, the sampling site was isolated, airdried, and isolated with cotton rolls, the supra-gingival biofilm was gently removed and then a fine sterile paper strip (Periopaper, Pro Flow, Amityville, NY, USA) was inserted into the peri-implant/periodontal sulcus/pocket until mild resistance was felt and left in place for 30 s. | The concentrations of RANKL, RANK and OPG were evaluated using enzyme-linked immunosorbent assays; they were compared between the groups and correlated with the clinical findings. | Non-proteomics | | 22708989 |
| P02818 | Osteocalcin | | x | x | 68057873 | 1 | 54,4 | M/F | Non-smoking | PICF and GCF sampling was performed using the previously described methods (Nomura et al. 1998, 2000) | An enzyme-linked immunoassay (EIA) kit | Non-proteomics | | 12519339 |
| P02818 | Osteocalcin | | x | x | 68057873 | 1,5 | 43,5 | M/F | | PISF samples were collected prior to clinical recordings, except PI. Peri-implant sulcus fluid samples were obtained according to the method as previously described (12, 13) using standardized paper strips Periopaper No. 593525 | The ICTP assay was conducted as described by Talpoika and Hamalainen. The OC assay was performed by using the protocol described by Windhagen et al. | Non-proteomics | | 19090910 |
| P14780 | Matrix Metalloproteinase-9 | | x | x | 68057873 | + | 22-68 | M/F | | PISF samples, one sample per implant, were collected with a filter strip placed into the sulcus for 4min. | | Non-proteomics | | 15015946 |
| P14780 | Matrix Metalloproteinase-9 | | x | x | 68057873 | + | | M/F | Non-smoking | Samples were obtained at mesiobuccal and distobuccal sites from all selected teeth and implants. Prior to the sampling, the area was gently dried with an air syringe and isolated by cotton rolls. If any obvious plaque was present on the visible surface of the implants and teeth, it was carefully removed with a curette. | The amount of serum albumin per sample was quantified by densitometric analysis of Coomassie-stained sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Relative activity of MMP-9 was determined from the densitometry of zymograms. Amounts and concentrations of TNC were evaluated by ELISA. | Non-proteomics | | 21429069 |
| Q9NPA2 | Matrix metalloproteinase-25 | | x | x | 68057873 | + | 18-58 | M/F | Non-smoking | GCF and PI-PISF samples were collected with paper strips from deep (>4 mm) periodontitis/PI pockets/lesions from CP, G-AgP and PI patients and from periodontally healthy (<3mm) and healthy peri-implant sites of controls. | Immunohistochemistry, immunofluorescent analysis, reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunoblotting were used to assess localisation, mRNA expression and molecular forms of MMP-25, MMP-26, HBD-1 and HBD-2 | Non-proteomics | | 17996844 |
| Q9NRE1 | Matrix metalloproteinase-26 | | x | x | 68057873 | + | 18-58 | M/F | Non-smoking | GCF and PI-PISF samples were collected with paper strips from deep (>4 mm) periodontitis/PI pockets/lesions from CP, G-AgP and PI patients and from periodontally healthy (<3mm) and healthy peri-implant sites of controls. | Immunohistochemistry, immunofluorescent analysis, reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunoblotting were used to assess localisation, mRNA expression and molecular forms of MMP-25, MMP-26, HBD-1 and HBD-2 | Non-proteomics | | 17996844 |
| P22894 | Neutrophil collagenase (MMP8) | | x | x | 68057873 | + | 67 | M/F | Smoking and non smoking | PISF sampling was performed at two different time-points by three distinct dentists. Initial PISF samples were collected from all implant sites of peri-implantitis patients and compared to randomly-selected healthy controls matched by age, gender and the implantation site | Collagenase presence were analyzed by western blotting with anti-human monoclonal antibodies specific for MMP-1, MMP-8 and MMP-13 with positive controls | Non-proteomics | x | 23083963 |
| P22894 | Neutrophil collagenase (MMP8) | | x | x | 68057873 | + | 21-86 | M/F | | Samples were collected with filter paper strips as described by Ingman et al. | Western immunoblotting with image analysis was used to quantitate the molecular forms of LN-5 gamma2-chain and MMP-8 in peri-implant sulcular fluid (PISF) from healthy and diseased implants | Non-proteomics | | 12656874 |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|--|--|---|---|----------|------|--------|-----|-------------------------|--|---|----------------|---|----------|
| P22894 | Neutrophil collagenase (MMP8) | | x | x | 68057873 | 9,7 | 21-86 | M/F | | Samples were collected with filter paper strips from peri-implant sulci from healthy and untreated diseased implant sites. | Western immunoblot method with polyclonal anti-human-MMP-8 and monoclonal anti-human-MMP-7 antibodies was used, and immunoreactivities were quantified with computer scanning program | Non-proteomics | | 14632921 |
| P09237 | Matrylisin 1 (MMP-7) | | x | x | 68057873 | 11,3 | 21-86 | M/F | | Samples were collected with filter paper strips from peri-implant sulci from healthy and untreated diseased implant sites. | Western immunoblot method with polyclonal anti-human-MMP-8 and monoclonal anti-human-MMP-7 antibodies was used, and immunoreactivities were quantified with computer scanning program | Non-proteomics | | 14632921 |
| P43235 | Cathepsin K | | x | x | 68057873 | + | 30-84 | M/F | Non-smoking | Gingival crevicular fluid collected from the buccal and lingual sites was adsorbed to filter strips. | Cathepsin K levels and total protein within the crevicular fluid were determined by immunoassay and the bicinchoninic method, respectively. | Non-proteomics | | 16553640 |
| P05186 | Alkaline phosphatase | | x | x | 68057873 | 5,9 | Adults | M/F | Non-smoking | Periimplant crevicular fluid (PICF) was collected | One hundred microliters of phosphate buffered saline (PBS, pH7.2) was added to each sample. The tubes were vigorously shaken for 1min and then centrifuged at 2000g for 5min, with the strips kept at the collar of the tube in order to completely elute PICF components. After removal of the strip, the supernate was divided into three aliquots, one for the determination of each biochemical compound. | Non-proteomics | x | 12010152 |
| P08246 | Neutrophil Elastase | | x | x | 68057873 | 12,8 | Adults | M/F | Non-smoking | Periimplant crevicular fluid (PICF) was collected | Elastase activity (EA) was determined using the fluorogenic substrate Meo-Suc-Ala-Ala-Pro-Val/7-amino-4-methylcoumarin | Non-proteomics | x | 12010152 |
| P01023 | Alpha 2-macroglobulin | | x | x | 68057873 | 8,1 | Adults | M/F | Non-smoking | Periimplant crevicular fluid (PICF) was collected | The inhibitor a2-macroglobulin (a2M) was determined by ELISA (Giannopoulou et al. 1992). | Non-proteomics | | 12010152 |
| P09429 | High mobility group protein B 1 | | x | x | 68057873 | + | 25-68 | M/F | Non-smoking | The expression of HMGB1 and HMGN2 mRNA in gingival tissues and gingival crevicular fluid (GCF) in chronic periodontitis (CP), generalised aggressive periodontitis (G-AgP) patients and healthy subjects was detected by real-time PCR | IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and HMGB1 levels in GCF, PI-PICF and healthy-PICF samples from different groups were determined by ELISA | Non-proteomics | | 21570059 |
| P05204 | Non-histone chromosomal protein HMG-17 | | x | x | 68057873 | + | 25-68 | M/F | Non-smoking | The expression of HMGB1 and HMGN2 mRNA in gingival tissues and gingival crevicular fluid (GCF) in chronic periodontitis (CP), generalised aggressive periodontitis (G-AgP) patients and healthy subjects was detected by real-time PCR | IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and HMGB1 levels in GCF, PI-PICF and healthy-PICF samples from different groups were determined by ELISA | Non-proteomics | | 21570059 |
| P60022 | Beta Defensin-1 | | | x | 68057873 | + | 18-58 | M/F | Non-smoking | GCF and PI-PISF samples were collected with paper strips from deep (>4 mm) periodontitis/PI pockets/lesions from CP, G-AgP and PI patients and from periodontally healthy (<3mm) and healthy peri-implant sites of controls. | Immunohistochemistry, immunofluorescent analysis, reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunoblotting were used to assess localisation, mRNA expression and molecular forms of MMP-25, MMP-26, HBD-1 and HBD-2 | Non-proteomics | | 17996844 |
| P10147 | Macrophage inflammatory protein-1 alpha | | x | x | 68057873 | + | | M/F | | Samples were taken from peri-implant sulcus using a filter paper technique. | Cytokine concentrations were assessed using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits. | Non-proteomics | | 20207110 |
| P02458 | Collagen alpha-1 (II) chain (C-telopeptide Pyridinoline) | | x | x | 68057873 | 1,1 | 43,5 | M/F | | PISF samples were collected prior to clinical recordings, except PI. Peri-implant sulcus fluid samples were obtained according to the method as previously described (12, 13) using standardized paper strips Periopaper No. 593525 | The ICTP assay was conducted as described by Talopouka and Hamalainen. The OC assay was performed by using the protocol described by Windhagen et al. | Non-proteomics | | 19090910 |
| Q13753 | Laminin subunit gamma 2 | | x | x | 68057873 | + | 21-86 | M/F | | Samples were collected with filter paper strips as described by Ingman et al. | Western immunoblotting with image analysis was used to quantitate the molecular forms of LN-5 gamma2-chain and MMP-8 in peri-implant sulcular fluid (PISF) from healthy and diseased implants | Non-proteomics | | 12656874 |
| Q99857 | Tenascin-C | | x | x | 68057873 | + | | M/F | Non-smoking | Samples were obtained at mesiobuccal and distobuccal sites from all selected teeth and implants. Prior to the sampling, the area was gently dried with an air syringe and isolated by cotton rolls. If any obvious plaque was present on the visible surface of the implants and teeth, it was carefully removed with a curette. | The amount of serum albumin per sample was quantified by densitometric analysis of Coomassie-stained sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Relative activity of MMP-9 was determined from the densitometry of zymograms. Amounts and concentrations of TNC were evaluated by ELISA. | Non-proteomics | | 21429069 |
| P05164 | Myeloperoxidase | | x | x | 68057873 | 14,4 | | M/F | | PISF was collected using micropipette from each implant site (from buccal crevice and from lingual/palatal crevice). The tip of micropipette was washed with sterile saline before insertion into the crevice. | Plastic vials containing PISF were weighed again to obtain the weight of PISF. MPO levels were measured with Bioxytechs MPO Enzyme immunoassay (Oxis International, Portland, OR, USA). The MPO-EIA method is an enzyme-linked immunoassay of the ELISA type. | Non-proteomics | | 15355396 |
| P05089 | Arginase 1 | | x | x | | | | M/F | Smoking and non smoking | Stimulated whole saliva was collected at the same time of the day to avoid the circadian effect on composition of the saliva. Saliva samples were centrifuged at 10,000 xg for 10 min and at 4 $^{\circ}$ C, and the supernatants were immediately stored at -20 $^{\circ}$ C to be used later to determine the arginase activity and the concentration of proteins. | The levels of salivary arginase activity were determined by the measurement of L-ornithine and expressed as mIU/mg of protein. | Non-proteomics | | 19089467 |
| P35408 | Prostaglandin E2 | | x | x | 68057873 | + | | M/F | Smoking and non smoking | PICF was collected at the 3rd, 6th, 12th, and 18th months after implantation of 72 implants. | The levels of salivary arginase activity were determined by the measurement of L-ornithine and expressed as mIU/mg of protein. | Non-proteomics | | 22814555 |