



CATÓLICA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LISBOA · PORTO · VISEU

ORALOMA DA PERI-IMPLANTITE

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

Por:

Rafaela Carina de Sousa Albino

Viseu, 2017



CATÓLICA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LISBOA · PORTO · VISEU

ORALOMA DA PERI-IMPLANTITE

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

Por:

Rafaela Carina de Sousa Albino

Orientador: Prof. Doutor Nuno Rosa

Co-Orientadores: Prof. Doutora Marlene Barros

Prof. Doutor André Correia

Viseu, 2017

"The best thing in life is to go ahead with all your plans and your dreams, to embrace life and to live everyday with passion, to lose and still keep the faith and to win while being grateful. All of this because the world belongs to those who dare to go after what they want. And because life is really too short to be insignificant."

—Charlie Chaplin

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Nuno Rosa,

Orientador e peça fundamental para a viabilidade deste projeto, cujo exemplo de dedicação suscitou em mim o gosto pela investigação. Obrigada por todo o apoio, motivação, disponibilidade e conhecimentos transmitidos ao longo deste processo.

À Professora Doutora Marlene Barros,

Pelos valiosos conhecimentos transmitidos ao longo da realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor André Correia,

Pelo exemplo de profissionalismo, competência e trabalho árduo, que me incita a querer fazer mais e melhor.

À minha mãe,

Pelo amor incondicional, compreensão inesgotável e por ser o meu grande pilar, principalmente nos dias mais difíceis. A tua força e determinação são uma inspiração para mim.

Ao meu pai,

Pela determinação, perseverança e coragem que sempre incutiu em mim, e pelo amor incondicional que perpetua. Sei que estarás orgulhoso, onde quer que estejas.

Ao Jorge,

Por todo o amor, carinho e compreensão, e por estares sempre lá, mesmo quando tudo falha. Não há palavras para descrever o quanto o teu apoio e ajuda foram inestimáveis ao longo deste processo. Obrigada por colorires a minha vida de todas as cores.

À Sofia,

Companheira desde o primeiro dia até ao último e agora, binómia para a vida. Obrigada por todas as aventuras vividas e momentos partilhados. Se estes 5 anos

foram tão especiais, em grande parte a ti o devo.

Ao André,

Pela amizade, apoio e por todas as gargalhadas. Porque há amigos que se tornam família.

À Rita,

Pelo companheirismo e amizade, e por tornar os dias de trabalho muito mais leves e divertidos.

Ao Luís e ao André,

Pela amizade e momentos partilhados.

A todos os colegas, professores e funcionários,

Por terem marcado de forma tão positiva o meu percurso académico.

Resumo

A reabilitação de zonas edêntulas pode ser efetuada com recurso a próteses dentárias implanto-suportadas. Estas proporcionam ao paciente uma situação clínica mais semelhante à dentição natural, traduzindo-se numa melhor qualidade de vida.

A evolução da implantologia, associada a motivos socioeconómicos, tem propiciado um aumento do número de implantes colocados nas últimas três décadas. Este facto, associado ao maior tempo de permanência *in vivo*, tem favorecido um aumento de casos reportados de peri-implantite. Esta é definida como uma inflamação dos tecidos peri-implantares com perda de osso de suporte, resultando em última análise na falha da solução protética.

Deste modo, a presente dissertação propôs-se a atualizar a informação molecular em peri-implantite, através da identificação e esclarecimento dos mecanismos moleculares com importância no estabelecimento e progressão da doença.

Esta investigação permitiu acrescentar 58 novas proteínas ao OralOma da peri-implantite, juntando-se às 38 previamente catalogadas. A análise funcional permitiu depreender um aumento da interferência de determinadas proteínas. Em particular, a sobre-regulação da IL1 β e MPO e a sub-regulação da IL-10 foram apontados como marcadores inflamatórios; um aumento de MMP8 parece sugerir o processo de destruição do tecido conjuntivo e a sobre-regulação do RANK, RANKL e TNF- α , bem como a sub-regulação da OPG, são promissores biomarcadores de remodelação óssea. Contudo, para que seja possível a utilização destes no futuro, é necessário o estabelecimento de um protocolo estandardizado de recolha e análise de PIGF e saliva, visando a caracterização dos valores padrão para cada substância, tal como existe atualmente para o sangue.

Espera-se que os dados gerados neste trabalho possam contribuir para a identificação de proteínas e mecanismos moleculares que possibilitem o diagnóstico precoce, a determinação da suscetibilidade do doente e a determinação do prognóstico dos implantes afetados. Este conhecimento poderá ajudar a orientar abordagens de tratamento personalizadas e avaliar o sucesso da terapêutica.

Palavras-chave: "*Peri-implantitis*", "*biomarkers*", "*proteome*", "*bone disease*", "*dental implants*"

Abstract

Rehabilitation of edentulous areas can be performed using implants-supported denture prostheses. These provide the patient with a clinical situation more similar to the natural dentition, improving their quality of life.

The evolution of implantology, associated with socioeconomic reasons, has led to an increase in the number of implants placed in the last three decades. This fact, associated to the longer *in vivo* maintenance, has favoured the incidence of peri-implantitis. This is defined as an inflammation of the peri-implant tissues with loss of supporting bone, ultimately resulting in failure of the prosthetic solution.

Accordingly, the present dissertation proposed to update the molecular information in peri-implantitis, through the identification and clarification of the molecular mechanisms with impact in the establishment and progression of the disease.

This investigation allowed to add 58 new proteins to the OralOma of peri-implantitis, joining the 38 previously catalogued. Functional analysis showed an increase in the interference of certain proteins. In particular, over-regulation of IL1 β and MPO and down-regulation of IL10 were indicated as inflammatory markers; an increase in MMP8 seems to suggest the process of connective tissue destruction; and over-regulation of RANK, RANKL and TNF- α , as well as the down-regulation of OPG, are promising biomarkers of bone remodelling. However, for the possible application of these in the future, it is necessary to establish a standard protocol for the collection and analysis of PICF and saliva, in order to characterize the pattern values for each substance, as it currently exists for blood.

It is hoped that the data generated in this work may contribute to the identification of proteins and molecular mechanisms that allow the early diagnosis, determination of the patient's susceptibility and determination of the prognosis of the affected implants. This knowledge can help guide personalized treatment approaches and evaluate the success of therapy.

Keywords: *"Peri-implantitis", "biomarkers", "proteome", "bone disease", "dental implants"*

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

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Lista de Figuras	xix
Lista de Tabelas	xxi
Lista de Abreviaturas	xxv
1 Introdução	1
1.1 Implantologia	1
1.1.1 Contextualização histórica	1
1.1.2 Implantologia contemporânea	2
1.1.3 Implante versus dente natural	3
1.2 Introdução às doenças peri-implantares	6
1.3 Peri-implantite	7
1.3.1 Definição/Diagnóstico	7
1.3.2 Epidemiologia	8
1.3.3 Fisiopatologia	9
1.3.4 Fatores de risco	11
1.3.5 Tratamento	14
1.4 Fluídos orais enquanto ferramentas de diagnóstico	15
1.4.1 Flúido crevicular	15
1.4.2 Saliva	16
1.5 Biomarcadores em doença peri-implantar	17
1.5.1 Moléculas envolvidas na resposta inflamatória	18
1.5.2 Moléculas envolvidas na remodelação dos tecidos de suporte	21
1.6 Objetivos	25

2	 Materiais e Métodos	27
2.1	Estratégias de Pesquisa	27
2.2	Anotação manual dos dados relativos às proteínas presentes e alteradas em Peri-implantite	28
2.2.1	Identificação da proteína	29
2.2.2	Proveniência da amostra	30
2.2.3	Relação com os estados de saúde e doença	30
2.2.4	Caracterização dos indivíduos da amostra	32
2.2.5	Métodos de recolha e análise da amostra	32
2.2.6	Caracterização do estudo	33
2.2.7	Outras informações	33
2.3	Análise da proveniência das amostras	33
2.4	Caracterização funcional	34
2.4.1	PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships)	34
2.5	Comparação com o OralOma normal – Diferença fracional	35
3	 Resultados e Discussão	37
3.1	Catologação das proteínas	37
3.1.1	Atualização do OralOma	37
3.1.2	Origem das proteínas identificadas	43
3.1.3	Relação com os estados de saúde e doença	44
3.1.4	Caracterização dos indivíduos da amostra	48
3.1.5	Métodos de recolha e análise da amostra	49
3.2	Caracterização funcional	50
3.2.1	Caracterização funcional das proteínas humanas envolvidas em peri-implantite	50
3.3	Comparação com o OralOma normal	55
3.3.1	Funções moleculares das proteínas envolvidas em peri-implantite	55
3.3.2	Procesos biológicos das proteínas envolvidas em peri-implantite	56
3.3.3	Vias de sinalização das proteínas envolvidas em peri-implantite, com origem no fluído crevicular	60
4	 Conclusões	63

Lista de Figuras

1.1	Comparação entre as estruturas de suporte dos implantes e dentes naturais. Adaptado de <i>Carl E. Misch. Dental Implants Prosthetics (2015)</i> ¹	5
2.1	Cabeçalhos que permitem a organização da informação recolhida através de estudos de proteómica da cavidade oral (proteínas identificadas na PI anotadas manualmente) numa tabela Microsoft Excel 2013.	29
2.2	Cabeçalhos da tabela Microsoft Excel 2013 relativos à identificação das proteínas da PI anotadas manualmente	29
2.3	Cabeçalhos da tabela Microsoft Excel 2013 relativos à proveniência das proteínas da PI anotadas manualmente.	30
2.4	Cabeçalhos da tabela Microsoft Excel 2013 relativos à relação das proteínas da PI anotadas com os estados de saúde e doença.	31
2.5	Cabeçalhos da tabela Microsoft Excel 2013 relativos à caracterização dos indivíduos dadores da amostra.	32
2.6	Cabeçalhos da tabela Microsoft Excel 2013 referentes aos métodos de recolha e análise das amostras.	32
2.7	Cabeçalhos da tabela Microsoft Excel 2013 relativos à caracterização dos estudos analisados.	33
2.8	Cabeçalhos da tabela Microsoft Excel 2013 relativos às características especiais das proteínas da PI.	33
3.1	Total de proteínas identificadas na base de dados SalivaTecDB para a PI, até à data da presente dissertação.	38
3.2	Total de proteínas identificadas na base de dados SalivaTecDB para a PI, até à data da presente dissertação (continuação).	39
3.3	Total de proteínas identificadas na base de dados SalivaTecDB para a PI, até à data da presente dissertação (continuação).	40

3.4	Total de proteínas identificadas na base de dados SalivaTecDB para a PI, até à data da presente dissertação (continuação).	41
3.5	Total de proteínas identificadas na base de dados SalivaTecDB para a PI, até à data da presente dissertação (continuação).	42
3.6	Total de proteínas identificadas na base de dados SalivaTecDB para a PI, até à data da presente dissertação (continuação).	43

Lista de Tabelas

1.1	Datada de 600 DC, esta mandíbula foi encontrada na América Central. Os Incas implantaram nesta três incisivos esculpidos a partir de conchas do mar. A formação de cálculos sobre estes três implantes indica que esta prática não se tratou de uma cerimónia fúnebre, mas sim uma substituição dentária fixa, funcional e estética. (Cortesia do Peabody Museum of Archaeology and Ethnology, Harvard University). Imagem adaptada de Carl E. Mish (2015) ¹	2
1.2	Mecanismos inflamatórios que conduzem à perda óssea na peri-implantite. Imagem adaptada de Hajishengallis G. (2014) ²⁷	10
1.3	OPG/RANK/RANKL como efetores comuns dos sistemas ósseo, imunológico e vascular. Estes são produzidos seletivamente por numerosos tipos de células e uma variedade de tecidos tais como linfócitos, osteoblastos e células endoteliais. O RANKL induz fortemente osteoclastogénese e, em seguida, reabsorção óssea através de sua ligação ao RANK. A OPG inibe a osteólise e bloqueia a interação RANKL/RANK. Embora a tríade OPG/RANK/RANKL seja o principal regulador do ciclo aposição/reabsorção óssea, existem outros controlos de diferenciação osteoclástica, como TNF- α e IL-1, capazes de modular as atividades biológicas desta tríade. Imagem adaptada de Theoleyre S. <i>et al</i> (2004) ⁶⁹	23
2.1	Esquemática dos objetivos traçados e da metodologia seguida para os alcançar.	27
2.2	Exemplo ilustrativo da visualização do site da Uniprot durante a atribuição do código UniProtKB AC, nome, nome do gene e organismo a uma determinada proteína.	30

2.3	Exemplo ilustrativo da visualização do site da Uniprot durante a atribuição do código UniProtKB AC, nome, nome do gene e organismo a uma determinada proteína.	35
3.1	Número de proteínas introduzidas neste trabalho comparativamente com o número de proteínas previamente inseridas.	37
3.2	Diagrama de Venn obtido pelo programa Venny, representando a proveniência das proteínas catalogadas.	44
3.3	Gráfico representativo da distribuição de proteínas com origem no fluido crevicular, obtido pelo PANTHER, para a ontologia 'Molecular Function'.	50
3.4	Gráfico representativo da distribuição de proteínas com origem no fluido crevicular, obtido pelo PANTHER, para a ontologia 'Biological Process'.	51
3.5	Gráfico representativo da distribuição de proteínas com origem no fluido crevicular, obtido pelo PANTHER, anotadas no nível 1 da ontologia 'Biological Process' na função Immune System Process.	52
3.6	Gráfico representativo da distribuição de proteínas com origem no fluido crevicular, obtido pelo PANTHER, anotadas no nível 2 da ontologia 'Biological Process' na função Immune Response.	52
3.7	Gráfico representativo da distribuição de proteínas com origem no fluido crevicular, obtido pelo PANTHER, anotadas no nível 1 da ontologia 'Biological Process' na função Response to stimulus.	53
3.8	Gráfico representativo da distribuição de proteínas com origem no fluido crevicular, obtido pelo PANTHER, para a ontologia 'Pathways'.	54
3.9	Distribuição das proteínas com origem em fluido crevicular e saliva total de pacientes com PI, segundo as funções moleculares em que intervém, através da ferramenta PANTHER. A função molecular que apresenta alteração estatisticamente significativa em relação ao OralOma normal encontram-se assinaladas com asterisco.	56
3.10	Distribuição das proteínas com origem em fluido crevicular e saliva total de pacientes com PI, segundo os processos biológicos em que intervém, através da ferramenta PANTHER. Os processos biológicos que apresentam alterações estatisticamente significativas em relação ao OralOma normal estão assinaladas com asterisco.	57

3.11 Distribuição das proteínas com origem em fluído crevicular e saliva total de pacientes com PI, segundo as vias de sinalização em que intervém, através da ferramenta PANTHER. As vias de sinalização que apresentam alterações estatisticamente significativas estão assinaladas com asterisco. 61

Lista de Abreviaturas

A2M – *Alpha 2-Macroglobulin* (Macroglobulina Alfa-2).

BOP – *Bleeding on Probing* (Sangramento à Sondagem Suave).

CSF2 – *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (Fator Estimulador de Colónias de Granulócitos e Macrófagos).

EBI – *European Bioinformatics Institute*.

ELANE – *Neutrophil Elastase* (Elastase Neutrofílica).

GCF – *Gingival Crevicular Fluid* (Fluido Crevicular Gengival).

ICT – *Inflammatory Cell Infiltrate* (Infiltrado Celular Inflamatório).

IL – *Interleukin* (Interleucina).

IL1RN – *Interleukin-1 Receptor Antagonist Protein* (Proteína Antagonista do Receptor de Interleucina-1).

LPS – *Lipopolysaccharide* (Lipopolissacarídeo).

MeSH – *Medical Subject Headings*.

MMP – *Matrix Metalloproteinase* (Metaloproteinase de Matriz).

MPO – *Myeloperoxidase* (Mieloperoxidase).

OPG – *Osteoprotegerin* (Osteoprotegerina).

PANTHER – *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships*.

PGE – *Prostaglandins E* (Prostaglandinas).

PI – Peri-Implantite.

PICF – *Peri-Implant Crevicular Fluid* (Fluído Crevicular Peri-Implantar).

PIR – *Protein Information Resource*.

PMN – *Polymorphonucleases* (Polimorfonucleases).

PPD – *Probing Pocket Depth* (Aumento da Profundidade de Sondagem).

RANK – *Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B* (Fator Nuclear de Ativação do Receptor kappa-B).

RANKL – *Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand* (Ligando do Fator Nuclear de Ativação do Receptor kappa-B).

rCAL – *Relative Clinical Attachment Level* (Nível Relativo de Inserção Clínica).

SIB – *Swiss Institute of Bioinformatics*.

TGFb1 – *Transforming Growth Factor beta-1* (Fator de Transformação de Crescimento beta-1).

Th – *T-helper*.

TIMP – *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* (Inibidor Tecidual das Metaloproteinases de Matriz).

TNF – *Tumor Necrosis Factor*.

UniProt – *Universal Protein Resource*.

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento Endotelial Vascular).

Capítulo 1

Introdução

1.1 Implantologia

1.1.1 Contextualização histórica

A implantologia é a segunda mais antiga disciplina da odontologia, sendo a primeira a cirurgia oral. As primeiras referências remontam a milhares de anos e abrangem várias das grandes civilizações ancestrais. Como exemplo pioneiro, há cerca de 4000 anos, os Chineses esculpam varas de bambu em forma de cavilhas e introduziram-nas no osso para substituição fixa dos dentes em falta. Mais tarde e de forma semelhante, os Egípcios reinventaram o *design* do mesmo encavilhamento usando metais preciosos. Seguindo pela linha temporal, foram encontradas evidências datadas de 600 D.C, que relatam a substituição de dentes perdidos por conchas de mar incrustadas contra o osso por parte dos Incas na América Central (ver Figura 1.1). Por outras palavras, a história demonstra claramente que o Homem desde sempre procurou reestabelecer as zonas edêntulas com soluções fixas, mantendo a forma aproximada de um dente natural¹ .

Maggiolo introduziu a história mais recente da implantologia em 1809 com o uso do ouro na forma da raiz de um dente. Por sua vez, em 1887, Harris relatou o uso de dentes feitos de porcelana, cujo interior teria um revestimento de platina. Muitos materiais foram testados e, no início de 1900, Lambotte fabricou implantes de alumínio, prata, latão, cobre vermelho, magnésio, ouro, aço banhado a ouro e níquel, tendo identificado a corrosão de vários destes metais nos tecidos orais, relacionada com a ação eletrolítica¹ .



Figura 1.1: Datada de 600 DC, esta mandíbula foi encontrada na América Central. Os Incas implantaram nesta três incisivos esculpidos a partir de conchas do mar. A formação de cálculos sobre estes três implantes indica que esta prática não se tratou de uma cerimônia fúnebre, mas sim uma substituição dentária fixa, funcional e estética. (Cortesia do Peabody Museum of Archaeology and Ethnology, Harvard University). Imagem adaptada de Carl E. Mish (2015)¹ .

Mais recentemente, em 1965, iniciaram-se os estudos clínicos de implantes em seres humanos com a filosofia Brånemark, tendo sido seguidos durante 10 anos. O termo osteointegração foi introduzido por Brånemark, tendo sido definido por este como o contato direto entre o osso e a superfície de um implante ao nível de microscopia óptica de ampliação. A sua documentação de casos clínicos anteriores, pesquisa de cirurgia e fisiologia óssea, cicatrização de tecidos moles e duros e aplicações restauradoras constituíram um trabalho sem precedentes¹ .

1.1.2 Implantologia contemporânea

A reabilitação de zonas desdentadas nos maxilares, sejam parciais ou totais, pode ser efetuada com recurso a próteses dentárias implanto-suportadas. Este tipo de próteses proporciona ao paciente uma situação clínica mais semelhante à presença de dentes naturais, o que naturalmente se traduz numa melhor qualidade de vida para o paciente. Paralelamente, os médicos dentistas devem dispor de todas as suas habilidades clínicas para ajudar os pacientes a combater o edentulismo pelo que, a utilização de implantes dentários tem vindo, gradualmente, a impor-se no mundo da Medicina Dentária. Desta forma, problemas dentários que historicamente se verificavam mais complexos podem hoje em dia ser solucionados de forma eficaz com este

tipo de tratamento^{2,3} .

Seja através da substituição de um único dente ou da reabilitação completa das arcadas dentárias, os objetivos da implantologia contemporânea passam por restituir ao paciente o contorno normal, função, conforto, estética, fonética e saúde oral. O que torna a implantologia única é a capacidade de atingir esse objetivo, independentemente da atrofia, doença ou lesão do sistema estomatognático. Como resultado de pesquisas contínuas, ferramentas de diagnóstico, planejamento de tratamento, *design* de implantes, materiais e técnicas, a previsibilidade de sucesso é agora uma realidade para a reabilitação de muitas situações clínicas desafiadoras¹ .

Estima-se que o número de implantes colocados por ano por cada 10.000 pessoas seja de 230 para Israel (o maior número), 180 para a Coreia do Sul e Itália, 140 para Espanha e Suíça, 60 para o Brasil, Holanda e Estados Unidos e de 20 para Taiwan e Reino Unido (o menor número¹) , sendo que mais de 2 milhões de implantes dentários são instalados em todo o mundo a cada ano⁴ . A longo prazo, é esperado um aumento de 12% a 15% na maioria dos países que utilizam implantes dentários no presente momento. Este aumento advém da crescente necessidade de tratamentos relacionados com a colocação de implantes e que resultam do efeito combinado de vários fatores, incluindo: a esperança média de vida, a perda dentária relacionada com a idade, as limitações e falhas da prótese fixa, as consequências anatômicas do edentulismo, o limitado desempenho de próteses removíveis, aspetos psicológicos relacionados com a perda de dentes, vantagens das restaurações implanto-suportadas e com o aumento da consciência pública¹ .

1.1.3 Implante versus dente natural

Nos dentes naturais, os tecidos moles circundantes têm um espaço biológico médio de 2.04 mm entre a profundidade do sulco e a crista do osso alveolar – 1.07 mm de tecido conjuntivo acima do osso e sobre este, 0.97 mm de epitélio juncional. Quer em torno de um implante como de um dente, as regiões sulculares são semelhantes em muitos aspetos - uma margem gengival livre com epitélio sulcular não queratinizado, com células epiteliais na sua base e células epiteliais juncionais. No entanto, visto que o dente natural tem duas regiões primárias que compõem o espaço biológico – ao contrário de um implante que apenas apresenta uma –, existe uma diferença fun-

damental. A aderência do tecido conjuntivo em torno de um dente atua como uma barreira física, impedindo a progressão bacteriana e evitando que a sonda penetre mais profundamente no sulco. O tecido em si é constituído por onze grupos de fibras gengivais diferentes (dentogengivais, alveologengivais, intracapilares, transgengivais, circulares, semi-circulares, dentoperiostais, trans-septais, periosteogengivais, intercirculares e intergengivais) e pelas fibras de Sharpey, distribuídos de forma perpendicular em relação à raiz do dente.

No que concerne aos implantes dentários, temos que o seu espaço biológico está estimado para cerca de 3.3 mm, valor que inclui a profundidade do sulco. Nestes casos, o selamento biológico é fornecido pelos hemidesmossomas que integram o epitélio juncional, sendo que a aderência da camada de mucopolissacarídeos à superfície do implante é inferior quando comparada com a de um dente natural. Para além disso, as fibras encontradas no tecido conjuntivo são periosteogengivais e apresentam apenas orientação paralela e circular em relação ao corpo do implante. Dito isto, uma infeção peri-implantar progredirá com maior facilidade, comparativamente com uma infeção periodontal. Adicionalmente, a interface implante-osso dá-se por anquiose funcional, não existindo ligamento periodontal. Por sua vez, o ligamento periodontal presente nos dentes naturais – que atua como um amortecedor viscoelástico –, é responsável pela dissipação da energia proveniente das cargas oclusais e pela diminuição da transmissão de *stress* ao osso subjacente. Desta forma, as forças oclusais são transmitidas muito mais rapidamente ao osso alveolar nos implantes dentários, aumentando assim modo o risco de reabsorção óssea¹. O resumo destas características encontra-se na Tabela 1.1.

Contrariamente à dentição natural, a ausência do ligamento periodontal coloca os tecidos peri-implantares em maior risco de infeção e trauma, pois estes mostraram-se menos resistentes ao aumento dos níveis de acumulação de placa bacteriana. Em resposta ao desafio bacteriano, esta progressão mais rápida e intensa da inflamação crónica acaba por afetar diretamente o tecido ósseo e, portanto, levar à destruição da interface osso-implante. Adicionalmente, a escassez de recetores de dor nesta interface faz com que a sintomatologia da PI (PI) seja geralmente menor e dispersa⁵, o que destaca a importância de um diagnóstico oportuno para prevenir essas doenças ou, pelo menos, de um tratamento precoce⁶.

Tabela 1.1: Comparação entre as estruturas de suporte dos implantes e dentes naturais. Adaptado de Carl E. Misch. *Dental Implants Prosthetics* (2015)¹.

Estrutura	Dente	Implante
Conexão ao osso	Cimento, osso e periodonto	Osteointegração e anquilose óssea funcional
Tecido conjuntivo	12 grupos: seis inserem-se, perpendicularmente às superfícies dos dentes, ↓ colagénio, ↑ fibroblastos	Apenas dois grupos: fibras paralelas e circulares, sem ligação à superfície do implante, ↑ colagénio, ↓ fibroblastos
Espaço biológico	2.04–2.91 mm	3.08 mm (incluindo o sulco)
Vascularização	Maior: Ligamento suprapariosteal e periodontal	Menor: apenas periosteal
Profundidade de sondagem (PPD)	3 mm no estado saudável	2.5-5 mm (dependendo da profundidade anterior do tecido mole)
Sangramento à sondagem (BOP)	Mais fidedigno	Menos fidedigno

Apesar das semelhanças entre as características clínicas e etiologia da PI e periodontite, existem diferenças histopatológicas críticas entre as duas lesões. No estudo realizado por Berglundh T. *et al*⁷, os autores utilizaram uma técnica de colocação de ligadura para promover a lesão tecidual, tendo verificado que nos tecidos em torno dos dentes ocorreu um processo "auto-limitante", com formação de uma cápsula protetora do tecido conjuntivo, que separou o infiltrado celular inflamatório (ICT) do osso alveolar. O mesmo não se verificou nos tecidos peri-implantares, pelo que o ICT se estendeu até à crista óssea. Embora a presença de células plasmáticas e linfócitos tenha ocorrido de igual forma nas duas patologias, porém os neutrófilos e macrófagos encontraram-se em maiores proporções na PI⁷. De forma semelhante, também Carcuac O. *et al*⁸ estudaram as diferenças entre estas duas patologias, através da realização de biópsias aos tecidos periodontais e peri-implantares. Estes autores verificaram um número superior de células inflamatórias nas secções de PI, bem como uma maior densidade de vascularização⁸. Previamente, o mesmo autor havia conduzido um es-

tudo experimental em cães, no qual relatou que as lesões verificadas na PI eram consideravelmente mais extensas e próximas do osso de suporte, para além de que apresentavam um maior número de osteoclastos quando comparadas com as lesões de periodontite⁹.

1.2 Introdução às doenças peri-implantares

O aumento exponencial do número de implantes colocados nas últimas décadas conduziu a um incremento da ocorrência de complicações relacionadas com este procedimento¹⁰. Do conjunto de possíveis complicações inerentes à colocação de implantes iremos dar particular ênfase às doenças peri-implantares, as quais compreendem a mucosite peri-implantar e a PI. Estas patologias são de natureza infecciosa e ocorrem quando se rompe o equilíbrio entre o hospedeiro e o agente patogénico¹¹. Assim sendo, da mesma forma que o tecido periodontal é vital para a estabilidade da dentição natural, tecidos peri-implantares saudáveis são essenciais para a longevidade dos implantes dentários¹². Contudo, as lesões encontradas nas doenças peri-implantares são consideravelmente mais significativas e apresentam características mais agressivas, quando comparadas com as doenças periodontais, não respondendo positivamente a terapias usadas tradicionalmente na periodontite¹³. Adicionalmente, o tratamento desta condição pode ser inconveniente e desconfortável para o paciente, e requer um esforço elevado em termos de recursos económicos. Assim, à medida que aumenta o número de pessoas que recorre a reabilitação oral com recurso a implantes, a PI surge como um problema *major* crescente na medicina dentária^{14,15}.

Embora o principal foco desta dissertação seja a PI, é importante dedicarmos alguma atenção à **mucosite peri-implantar**. Esta apresenta-se como uma lesão inflamatória reversível, correspondendo à gengivite na dentição natural¹². Clinicamente, pode ser identificada pelo aparecimento de vermelhidão e edema dos tecidos moles peri-implantares, sendo o parâmetro chave para o seu diagnóstico o sangramento à sondagem suave (0.25 N)^{11,16,17}.

A mucosite precoce e tardia caracteriza-se pela alteração da composição da placa bacteriana, com aumento dos microrganismos Gram-negativos, sendo que estes, por sua vez, ativam uma resposta localizada do hospedeiro. Os produtos da resposta

inflamatória que ocorrem dentro do periodonto também estão presentes no fluido crevicular peri-implantar (PICF) no caso da mucosite, tendo estes de igual forma, vindo a ser utilizados para comparar os estados de saúde e doença¹⁸. Como último ponto, a prevenção apresenta particular destaque, devido ao potencial risco de evolução para PI se a mucosite permanecer sem tratamento¹⁹, especialmente tendo em conta que esta é reversível quando tratada adequadamente, ao contrário da PI cujos resultados são ainda imprevisíveis²⁰. Ao contrário da primeira cujos resultados são ainda imprevisíveis, a segunda é reversível quando tratada adequadamente²⁰. Como tratamento eficaz para a mucosite, destaca-se a terapia mecânica não-cirúrgica quando associada à utilização de colutórios antissépticos¹⁶.

De seguida, irá ser aprofundado em maior detalhe o tema da PI enquanto objeto de estudo dentro do campo da implantologia.

1.3 Peri-implantite

1.3.1 Definição/Diagnóstico

A PI é definida como uma reação inflamatória induzida por bactérias, que afeta os tecidos circundantes dos implantes dentários osteointegrados, em função oclusal, resultando em última análise na perda de osso de suporte^{4,21}. Esta patologia constitui a complicação biológica major associada à terapia com implantes dentários²², podendo em última análise conduzir à falha do implante e da solução protética. É caracterizada pela diminuição do nível do osso alveolar de suporte (avaliada radiograficamente) em associação com sangramento à sondagem suave (BOP), aumento da profundidade de sondagem (PPD), diminuição dos níveis relativos de inserção clínica (rCAL), supuração, edema da mucosa e vermelhidão, sendo que normalmente a sintomatologia está ausente^{11,16,17}. Numerosos estudos têm sido conduzidos para avaliar a precisão dos procedimentos de diagnóstico clínico e radiográfico de rotina para doenças peri-implantares²³, sendo que estes foram considerados não suficientemente sensíveis para fornecer informações diagnósticas precisas acerca da taxa de risco, início e atividade da doença, prognóstico e resultados do tratamento⁵. As medições clínicas em torno dos implantes podem estar dependentes da força e direção da sondagem, geometria do implante, desenho da prótese e biótipo de tecido mole peri-

implantar²⁴ .

O colapso inicial da interface implante-tecido inicia-se na crista óssea, independentemente da abordagem cirúrgica (submerso ou não-submerso). Esta perda óssea inicial é observada após um ano em função, seguido por uma perda mínima - até 0.2 mm anualmente¹¹ .

É assumido que o aparecimento, gravidade e extensão da doença depende de uma variedade de características individuais. Além de higiene oral, o tabagismo e condições sistêmicas, tais como doenças decorrentes de imunodeficiência, diabetes e obesidade, são considerados fatores-chave para a rutura progressiva do tecido peri-implantar²⁵ . A reabsorção óssea pode ser desencadeada por stress oclusal, bactérias ou uma combinação de ambos. A primeira ocorre sem intervenção bacteriana enquanto agente causador primário, contudo, após a perda óssea inicial dá-se um aumento da profundidade do sulco, diminuindo no seu interior a concentração de oxigênio, e promovendo assim a proliferação de bactérias anaeróbias. Posto isto, estas podem tornar-se então os principais promotores da perda óssea contínua¹ .

Com vista ao estabelecimento do diagnóstico de PI e à avaliação da sua progressão, é fundamental determinar a *baseline*, ou seja, deve proceder-se à realização de uma radiografia periapical após remodelação fisiológica, bem como à medição dos valores de sondagem. Esta monitorização ser efetuada pelo menos uma vez por ano de modo a permitir um diagnóstico precoce^{16,17} .

1.3.2 Epidemiologia

Com o intuito de comprovar a elevada frequência destas complicações, dois estudos transversais são descritos na literatura disponível, com amostras de 662 (3413 implantes) e 216 indivíduos (987 implantes), respetivamente^{16,17} . No primeiro grupo verificou-se a ocorrência de mucosite peri-implantar em 80% dos indivíduos e em 50% dos locais do implante, enquanto a PI foi identificada em 28% e 56% de indivíduos e em 12% e 43% dos locais do implante, como mencionado no segundo estudo^{16,17,26} .

Na revisão sistemática realizada por Derks e Tomasi (2015), os estudos identificados demonstram um intervalo de prevalências para a mucosite peri-implantar de 19% a 65% e para a PI de 1% a 47%. Esta variabilidade nos resultados obtidos é explicada em parte por questões metodológicas, nomeadamente a heterogeneidade

nas definições utilizadas. Assim sendo, os autores que obtiveram 47% de prevalência, consideraram implantes com perda óssea a partir de 0.4 mm e os que obtiveram 1%, incluíram apenas implantes com perda óssea superior a 5 mm²⁰. Posto isto, urge que se estabeleça um método padronizado para o diagnóstico e classificação das doenças peri-implantares.

1.3.3 Fisiopatologia

A saúde peri-implantar requer um estado inflamatório controlado que possa manter a homeostasia entre o hospedeiro e o seu microbiota. No entanto, defeitos no estado imuno-inflamatório do hospedeiro, condições predisponentes ou fatores ambientais, podem alterar este equilíbrio, propiciando que o biofilme venha a incluir microrganismos patobiontes. Face a esta microbiota disbiótica, os neutrófilos são recrutados para a bolsa peri-implantar interagindo com tipos de células imunes adicionais, como é o caso dos macrófagos, células dendríticas e células T. Neste processo são produzidos mediadores pró-inflamatórios — como o TNF- α , IL-1 β e IL-17 —, e promovem a diferenciação de células Th-17, que contribuem para a exacerbação da resposta inflamatória. A IL-17 produzida pelos Th17, atua sobre tipos de células inatas do tecido imune e conjuntivo, como neutrófilos, fibroblastos e osteoblastos. Através dessas interações, a IL-17 induz a produção de quimiocinas CXCL, metaloproteinases de matriz (MMPs) e outras moléculas destruidoras de tecidos (espécies reativas de oxigénio - ROS). Induz igualmente a expressão do receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), que impulsiona a maturação dos precursores dos osteoclastos. Os linfócitos ativados (células B e T, especificamente Th-1 e Th-17) desempenham um papel importante na reabsorção óssea patológica através do mesmo mecanismo dependente de RANKL, enquanto a osteoprotegerin (OPG) inibe a interação de RANKL com seu recetor funcional (RANK) nos osteoclastos. A razão RANKL/OPG aumenta com o aumento da atividade inflamatória. Os neutrófilos ativados expressam RANKL ligado à membrana e podem estimular diretamente a osteoclastogénese se estiverem suficientemente próximos do osso²⁷.

De forma inversa, a citocina anti-inflamatória IL-10 - produzida por células reguladoras T (Tregs), bem como o interferon- γ (produzido por células Th-1) e IL-4 mais IL-13 (produzido por células Th-2) podem suprimir a osteoclastogénese. A interação

celular adaptativa inata é consideravelmente mais complexa do que aqui descrita, mas serve para ilustrar os principais mecanismos destrutivos que operam no contexto da infecção e inflamação periodontal não resolvidas²⁷. Estes encontram-se representados na Figura 1.2.

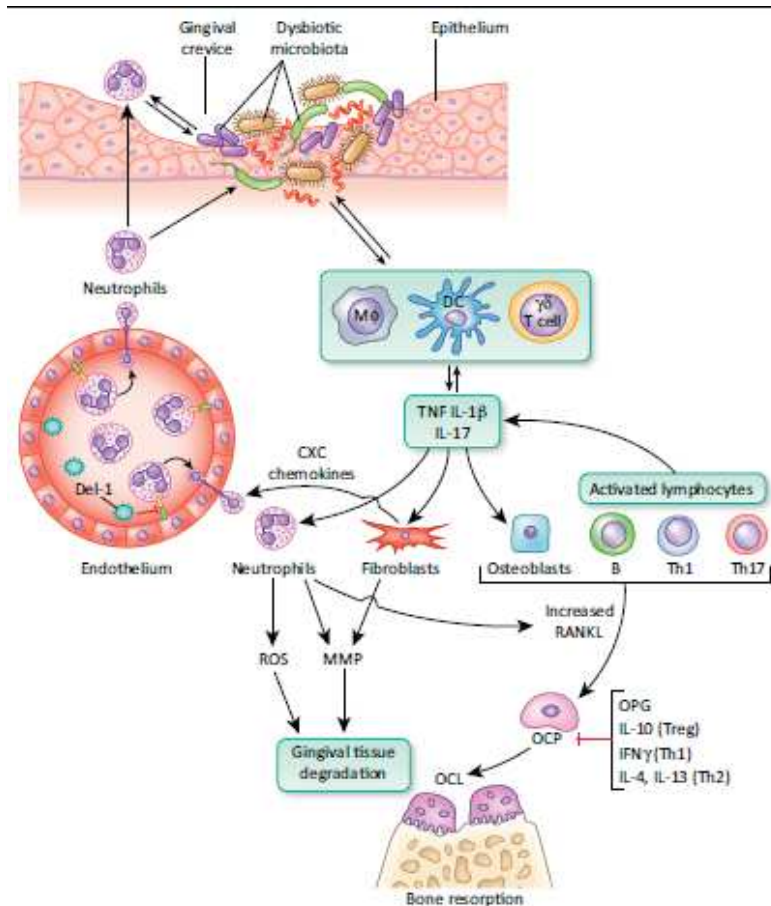


Figura 1.2: Mecanismos inflamatórios que conduzem à perda óssea na peri-implantite. Imagem adaptada de Hajishengallis G. (2014)²⁷.

Esta patologia foi descrita como uma infecção site-specific, apresentando muitas características em comum com a periodontite crônica sendo, porém, a lesão inflamatória dos tecidos moles e a perda óssea mais exuberantes em torno dos implantes¹⁸.

1.3.4 Fatores de risco

A PI apresenta origem multifatorial, onde uma resposta aberrante do hospedeiro combinada com a agressão bacteriana, pode contribuir para o desenvolvimento da destruição do tecido em torno dos implantes phantoma¹⁸. Posto isto, apesar da sua natureza infecciosa, esta patologia pode ser desencadeada e/ou perpetuada por fatores iatrogénicos, tais como excessos de resíduos de cimento, inadequado assentamento do *abutment*, sobrecontorno da prótese, mau posicionamento do implante ou complicações técnicas. Para além disso, a perda óssea induzida pelo trauma de colocação do implante no osso primitivo pode persistir quando este ultrapassa a sua capacidade de adaptação¹⁷. Da mesma forma, existem inúmeros fatores de risco fortemente associados a esta patologia, nomeadamente, pacientes com higiene oral deficitária, história de periodontite e indivíduos fumadores¹⁵; e ainda fatores cuja evidência de associação é limitada, tais como, pacientes com diabetes *mellitus* descontrolada, consumo de álcool, fatores genéticos e acabamento da superfície do implante¹⁶.

No estudo conduzido por Derks e Schaller (2016), verificaram que pacientes com periodontite e com ≥ 4 implantes, implantes de determinadas marcas, reabilitação protética realizada por médicos dentistas generalistas, bem como implantes instalados na mandíbula e com uma distância inferior a ≤ 1.5 mm da margem da prótese à crista alveolar, exibiram um risco mais elevado de desenvolver PI moderada/severa.¹⁴

O estabelecimento de perfis de risco para a doença peri-implantar pode tornar mais fácil prever que implantes estarão em risco de desenvolver esta complicação, auxiliar na tomada de decisão clínica, através da seleção do tratamento individual mais efetivo e estimar as possibilidades de sucesso¹⁸. Assim sendo, irão ser abordados em particular os fatores de risco mais relevantes na literatura.

Invasão do espaço biológico

A manutenção de uma distância inferior a ≤ 1.5 mm da margem da prótese à crista alveolar sugere invasão do espaço biológico, ou seja, indica que a coroa interferiu numa fase inicial com o selamento mucoso ao redor do implante, promovendo desta forma o aparecimento da doença.¹⁴ A espessura e qualidade dos tecidos moles no local de implantação é importante, uma vez que reflete o grau de capacidade tampão

dos tecidos¹⁸ .

História prévia de periodontite

Inúmeros artigos têm abordado esta questão, tendo muitos deles verificado uma incidência aumentada de PI em pacientes com perda dentária associada a periodontite^{22,28-31} .

No estudo realizado por Cho-Yan Lee,³² verificou-se que implantes colocados em pacientes periodontalmente comprometidos (PPC) que apresentavam bolsas residuais no *follow-up*, exibiram valores mais elevados de PPD e perda óssea, quando comparados com implantes colocados em pacientes periodontalmente saudáveis (PPS) ou PPC sem evidência de bolsas residuais. Posto isto, concluíram que mais do que a história prévia de periodontite, o fator determinante seria o controlo periodontal, realçando a importância de uma efetiva terapia periodontal.

Placa bacteriana

Um grande número de espécies bacterianas formam massas de película viscosa (placa), constituindo o fator etiológico predominante para a progressão da doença peri-implantar¹⁸ . Esta representa um importante fator de risco para o desenvolvimento de PI, tendo sido encontrada uma correlação positiva entre a acumulação de placa e a perda óssea marginal em torno dos implantes dentários. Esta evidência explica a observação de que a participação num programa de manutenção de suporte resulta numa menor prevalência desta patologia³³ .

Diabetes

A diabetes é uma doença sistémica que resulta numa ampla gama de mecanismos que podem protelar a cicatrização de feridas e aumentar a suscetibilidade de um paciente à infeção ou perda de implante³⁴ . Isto ocorre porque a hiperglicemia crónica prejudica o reparo tecidual e os mecanismos de defesa do hospedeiro. Além disso, uma maior formação e acumulação de produtos finais de glicosilação avançada nos tecidos peri-implantares aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β , IL-18) e metaloproteinases de matriz (MMP8 e MMP9) na saliva e fluído crevicular, podendo comprometer a osteointegração e sobrevivência a longo prazo de pacientes com hiperglicemia crónica³⁵ .

Embora a associação entre diabetes e perda de implantes tenha sido abordada em análises sistemáticas por Kotsovilis *et al*³⁶ e Mombelli e Cionca,³⁷ existe apenas um estudo que descreve a associação entre diabetes e PI. Ferreira S.D. *et al*³¹ relataram que pacientes com diabetes descontrolada apresentavam um maior risco de desenvolver PI. No entanto, é pertinente mencionar que um adequado controle glicêmico - em pacientes previamente diagnosticados com diabetes – desempenha um papel importante para uma osteointegração bem-sucedida e uma manutenção da sobrevivência dos implantes a longo prazo.³⁵

Tabagismo

A prevalência e a gravidade das doenças periodontais nas suas diversas formas são elevadas entre os fumadores, comparativamente com os não fumadores. O tratamento com recurso a implantes dentários é significativamente influenciado pelo vício do tabagismo: o tabaco age ao nível das defesas do hospedeiro, da destruição da matriz extra-celular, do aumento da perda óssea e do comprometimento da capacidade de regeneração. Desta forma, surge associado a um aumento na taxa de insucesso na osteointegração, a uma maior dificuldade na manutenção da higiene oral e a uma maior prevalência de ocorrência de PI³⁸ .

Contudo, a evidência disponível para o hábito de fumar enquanto indicador de prognóstico para o sucesso do tratamento da PI é limitado e conflituante. Um extenso estudo retrospectivo³⁹ sugere que esta prática, bem como a sua dose podem estar associados à falha no tratamento da PI porém, o mesmo não foi fundamentado nos estudos prospetivos de Serino e Turri⁴⁰ e Heitz-Mayfield *et al*³⁴ .

Resíduos de cimento

Uma abordagem convencional para a restauração com implantes dentários é a utilização de próteses fixas cimentadas. No entanto, a inadequada remoção do cimento residual pode conduzir a PI, sendo que a sua manutenção no sulco peri-implantar tem sido associado à inflamação dos tecidos, BOP, supuração, aumento da PPD, evidência radiográfica de perda óssea e desconforto do paciente³⁵ .

1.3.5 Tratamento

Embora algumas lesões iniciais de PI possam ser tratadas de forma eficaz apenas com recurso a tratamento mecânico, as lesões mais avançadas requerem intervenção cirúrgica adicional para alcançar a resolução da doença¹⁶. Nestas, a terapia cirúrgica tem-se revelado imprescindível, pois nenhum outro método permite o acesso direto às superfícies contaminadas dos implantes, visando o seu desbridamento. Tem-se verificado a utilização de diversos procedimentos de descontaminação, que inclui técnicas mecânicas e químicas, contudo, nenhum método ou combinação de métodos demonstrou ser mais eficiente¹⁶. Regimes de terapia adjuvante com antibióticos sistémicos são frequentemente aplicados por rotina em casos de tratamento cirúrgico da PI, sem se avaliar de facto o seu benefício. A discrepância no início e progressão da doença entre os pacientes e a grande variação nos métodos de tratamento cirúrgico dificultam contudo as análises e conclusões⁴¹. Um relatório de consenso do 8º Workshop Europeu sobre Periodontologia enfatizou a necessidade de estabelecer uma terapia padronizada para o tratamento da PI⁴².

Com o intuito de clarificar esta questão, Carcuac *et al*⁴¹ realizaram um estudo que procurou verificar a eficácia da terapia adjuvante de antibióticos sistémicos e o uso local de clorhexidina para a descontaminação da superfície do implante no tratamento cirúrgico da PI. Estes autores obtiveram sucesso em 45% de todos os implantes, mas foi maior em implantes com uma superfície não modificada (79%) do que aqueles com superfície modificada (34%), tendo concluído que a aplicação local de clorhexidina não teve efeito geral sobre os resultados do tratamento. Por outro lado, apuraram ainda que a terapia adjuvante com antibióticos sistémicos não teve impacto no sucesso do tratamento nos implantes com superfície não modificada, ao contrário dos implantes com superfície modificada, em que esta revelou um efeito positivo⁴¹.

Alguns estudos⁴³⁻⁴⁶ têm vindo a recomendar o uso de lasers como um complemento ao tratamento não cirúrgico convencional da PI. Romanos e Nentwig⁴³ investigaram a eficácia de um laser de CO₂ na descontaminação de implantes acometidos por PI. Os parâmetros clínicos e radiográficos foram avaliados na *baseline* e 2 anos após tratamento. Os resultados evidenciaram um preenchimento ósseo quase completo dos defeitos peri-implantares, tendo concluído portanto que a utilização de lasers de CO₂ constitui uma opção eficaz para o tratamento da PI.

Até o momento, não existem evidências claras acerca de qual é a intervenção mais eficaz para o tratamento da PI. A terapia com lasers e a cirurgia ressetiva com implantoplastia (modificação da topografia da superfície do implante) têm apresentado resultados promissores. Todavia, é necessária a realização de mais estudos que corroborem estes dados, com vista à implementação de protocolos de tratamento padronizados para a PI^{16,35,47}.

1.4 Fluídos orais enquanto ferramentas de diagnóstico

1.4.1 Fluido crevicular

O fluido crevicular peri-implantar (PICF) é semelhante em composição ao fluido crevicular gengival (GCF) que se encontra em torno dos dentes naturais, sendo que os pacientes que apresentam PI geralmente evidenciam um aumento no volume de PICF⁴⁸. Devido à especificidade do processo de peri-implante, esta rede deve ser controlada por processos locais, pelo que o fluido crevicular fornece um meio não-invasivo para estudar a resposta do hospedeiro, sob a forma de alterações metabólicas e bioquímicas precoces¹⁸.

Considera-se que o conteúdo bioquímico da PICF reflete precisamente os processos decorrentes nos tecidos peri-implantares. Através da avaliação de um grande número de citocinas no PICF, em diferentes estágios da doença, dados importantes sobre o estado dos tecidos peri-implantares podem ser obtidos¹⁸. Contudo, existe alguma falta de consistência na literatura que se deve provavelmente ao facto de o fluxo de PICF ser relativamente escasso, quando comparado com outros meios. A este junta-se a falta de uniformidade de estratégias entre estudos, o que acrescenta mais dificuldade em padronizar os níveis de deteção. Alguns estudos descrevem dados sob a forma de percentagens de deteção, outros em níveis de biomarcadores e outros em concentrações. Esta falta de consistência nos resultados relatados na literatura complica a interpretação do valor em diagnóstico destes biomarcadores⁶.

1.4.2 Saliva

A saliva foi identificada há muito como um promissor fluído de diagnóstico para uma vasta gama de patologias, quer orais quer sistémicas. A sua composição proteica é fornecida essencialmente pelas secreções das glândulas salivares *major* (parótida, submandibular, sublingual), mas também pelas glândulas salivares *minor*, GCF, língua, mucosa oral, moléculas de origem microbiana e plasma⁴⁹.

Este fluído apresenta claras vantagens em relação ao sangue, nomeadamente o facto de possibilitar a sua recolha através de métodos simples e não-invasivos, possui menor risco de disseminar infeções, menor necessidade de pré-processamento das amostras e acarreta menos custos⁵⁰. A saliva possui também vantagens em relação ao PíCF, pois permite a colheita de volumes de amostra substancialmente superiores, a principal limitação deste. O facto de possuir uma concentração de algumas proteínas inferior ao PíCF, frequentemente dificultava a deteção de biomarcadores. Contudo, técnicas modernas como o Multiplex e os mais recentes avanços em espectrometria de massa têm vindo a colmatar esta falha, permitindo a utilização da saliva como uma potencial fonte de biomarcadores, com vista ao desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e tratamento⁵¹.

Inúmeros avanços têm sido feitos na investigação em saliva, sendo que dispositivos de diagnóstico miniaturizados já estão a ser desenvolvidos e prometem alcançar o diagnóstico de doenças infecciosas, cancro, doenças cardíacas e muitas outras doenças sistémicas com apenas uma gota de saliva⁵². Apesar destes progressos, este fluído apresenta algumas limitações: até agora a generalidade dos biomarcadores identificados não pertencem aos componentes intrínsecos da saliva, sendo derivados do soro que se deslocam para a saliva por meio da difusão dos tecidos circundantes da cavidade oral, maioritariamente do fluido crevicular gengival. Assim, no que diz respeito a estes biomarcadores, a saliva só pode ser considerada como fonte secundária de informação⁵². Adicionalmente, a saliva apresenta diferenças entre indivíduos ao nível do fluxo salivar, composição e concentração proteica⁵³. Estas disparidades existem igualmente no sangue, contudo, a padronização das metodologias de recolha e análise há muito implementadas, permitiram a identificação de valores padrão para cada substância.⁵² Em suma, são importantes estudos como o de Rosa *et al* que implementem um protocolo padronizado de recolha e análise deste fluído, visando

a caracterização dos valores padrão para cada substância, de modo a que a saliva se possa tornar um meio de diagnóstico alternativo e/ou complementar aos tradicionalmente utilizados⁵³.

1.5 Biomarcadores em doença peri-implantar

A PI é uma condição progressiva que, se não tratada, envolve 3 fases biológicas: inflamação, destruição do tecido conjuntivo e reabsorção óssea. Como tal, os investigadores têm procurado concentrações de moléculas associadas a estas 3 fases em fluidos orais, com o objetivo de encontrar preditores precoces de suscetibilidade, e detetar as moléculas associadas com os pontos iniciais, intermediários e tardios desta doença⁵⁴.

Até agora, a determinação da atividade da doença peri-implantar foi baseada em observações clínicas e radiográficas. Usando esta abordagem, estágios muito iniciais de um processo patológico não são passíveis de deteção. Numa tentativa de complementar estes métodos, foram propostos procedimentos diagnósticos alternativos, especialmente aqueles com características não-invasivas²⁴.

Um biomarcador é definido como uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica. Portanto, os biomarcadores podem ser considerados uma potencial solução diagnóstica com a capacidade de compensar algumas das limitações referidas das ferramentas clínicas de rotina quando aplicadas ao diagnóstico de PI⁶.

Uma vez que a PI pode estar latente nos seus estádios iniciais, a análise de biomarcadores no PIGF e saliva pode servir como uma ferramenta para:

- O diagnóstico precoce;
- Determinação da suscetibilidade do doente;
- Determinação do prognóstico dos implantes afetados, através da identificação de biomarcadores específicos envolvidos no início e na progressão da doença;
- Ajudar a orientar abordagens de tratamento distintas para cada indivíduo;
- Avaliar sucesso da terapêutica^{4, 24, 28, 54}.

Marcadores bioquímicos presentes em PICF e saliva podem indicar a instalação de PI mais precocemente, permitindo a intervenção antes que quantidades substanciais de osso de suporte se percam⁵⁵. Os biomarcadores representam, portanto, uma ferramenta de diagnóstico atraente e promissora na implantologia oral, uma vez que têm a capacidade de fornecer informação em tempo real dos processos em curso que afetam o metabolismo ósseo e, como tal, são capazes de compensar algumas das limitações das atuais ferramentas de diagnóstico.

1.5.1 Moléculas envolvidas na resposta inflamatória

Entre os muitos mediadores inflamatórios e imunológicos identificados no PICF, as **citocinas** têm atraído especial atenção. Estas são proteínas segregadas pelas células da imunidade inata e adaptativa que medeiam muitas das funções dessas células, constituindo mensageiros intercelulares que são essenciais para a patogênese de muitas doenças, incluindo a PI. Estes mediadores solúveis de reações imunes presentes em PICF são produzidos como resultado da interação fisiológica entre o epitélio gengival e leucócitos locais com a placa bacteriana e microorganismos orais, desempenhando também papéis importantes na homeostase dos tecidos¹⁸. Concomitantemente, os desequilíbrios entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias geralmente impedem a resolução da inflamação e, em vez disso, conduzem à perpetuação da doença e à destruição dos tecidos²⁴.

Na periodontologia e implantologia, estão envolvidos na alteração e reparação de tecidos periodontais ou peri-implantares relacionados com a inflamação. Determinadas citocinas têm sido propostas como marcadores de destruição de tecido periodontal ou peri-implantar, potencialmente válidos para determinar o diagnóstico ou prognóstico destas patologias¹⁸. De seguida apresentam-se algumas dessas moléculas e as suas potencialidades no contexto das doenças peri-implantares.

As **Interleukin-1 Beta (IL-1 β)** são citocinas que se relacionam com a destruição tecidual e envolvem a estimulação da reabsorção óssea e a indução de proteinases que degradam os tecidos, estando estes efeitos dependentes da sua concentração nos tecidos¹⁸. Sabe-se que a IL-1 β regula a degradação dos componentes da matriz extracelular do sistema de plasminogénio e a atividade da colagenase na inflamação e na cicatrização de feridas. Foi demonstrado que a inibição da IL-1 β reduziu a destruição

dos tecidos e a progressão da inflamação tecidual²⁵ .

O **Tumor necrosis factor (TNF- α)** é uma citocina pró-inflamatória com propriedades semelhantes à IL-1 β . É o principal mediador em resposta a bactérias Gram-negativas e a concentração de TNF- α reflete a quantidade de bactérias e o estágio da inflamação¹⁸ . Um aumento local ou sistêmico na concentração de TNF- α conduz à desregulação 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 apoptose⁵⁶ . Desta forma, reduz a capacidade de reparação do tecido peri-implantar e potencia a progressão da doença²⁵ .

O **ligando da molécula CD40** humana solúvel (CD40L) é um membro da super-família TNF e liga-se a esta na superfície das células apresentadoras de antígeno. Esta pode ativar a maturação de células B, é essencial para a ativação de células Th e constitui um conhecido indicador de risco de doenças cardiovasculares⁴ . Chaturvedi R. *et al*⁵⁷ relataram que os níveis de CD40L no GCF se mostraram significativamente aumentados no grupo com periodontite ($p \leq 0,001$) e relacionados com o aumento da gravidade da doença. No pós-tratamento, os níveis diminuíram significativamente⁵⁷ .

A **Interleukin-15 (IL-15)** é essencial para a homeostase de células T, sendo que níveis aumentados desta proteína na circulação e tecidos inflamados têm sido relatados em várias doenças auto-imunes, incluindo a artrite reumatoide⁵⁸ . Tymkiw K.D. *et al*⁵⁹ relataram níveis elevados de IL-15 no GCF de indivíduos com periodontite em comparação com indivíduos periodontalmente saudáveis.

A **Interleukin-10 (IL-10)** é uma citocina anti-inflamatória, produzida por células Th-2 (TH2), macrófagos e células B, que inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ . No entanto, IL-10 é um estimulador das células B, aumentando a proliferação e diferenciação destas⁶⁰ .

Os neutrófilos polimorfonucleares são a primeira linha de defesa não específica. A **Myeloperoxidase (MPO)** é a proteína mais abundante nos neutrófilos e é a única peroxidase que catalisa a conversão de peróxido de hidrogénio e cloreto em ácido hipocloroso, sendo este é um poderoso agente oxidante envolvido no mecanismo de defesa contra agentes infecciosos. Contudo, sob condições de ativação incontrolável ou excessiva, pode atuar sobre as células do hospedeiro e inativar fatores humorais.

Para além disso, devido ao seu amplo espectro de reatividade, o ácido hipocloroso atua como mediador de muitos processos inflamatórios. Portanto, a MPO está envolvida na homeostase celular e desempenha um papel importante na iniciação e agravamento dos processos inflamatórios agudos e crónicos. Assim sendo, um aumento da atividade de MPO em diferentes processos patológicos está associado a um risco aumentado de stress oxidativo, como é o caso de doenças infecciosas locais ou gerais e doenças inflamatórias^{61,62}.

A **Neutrophil Elastase (ELANE)** é uma das principais enzimas dos grânulos azurófilos de leucócitos humanos e, durante a inflamação, sabe-se que a sua libertação contribui para o dano tecidual. No entanto, a atividade desta protease é modulada pela presença de inibidores produzidos localmente ou circulantes no plasma.⁵⁵ Como tal, é importante esclarecer o equilíbrio entre a ELANE e os seus inibidores.

Durante a última década, foi identificada uma superfamília de proteínas quimiotáticas para leucócitos, designada por quimiocinas. As quimiocinas atraem seletivamente e ativam diferentes sub-populações de leucócitos e são mediadores-chave de uma variedade de condições fisiopatológicas, incluindo a inflamação^{18,24}. Deste grupo irá ser dado particular destaque à IL-8 e ao MIP-1 α . A **Interleukin-8 (IL-8)**, um dos membros da sub-família CXC de quimiocinas específica de neutrófilos, é um potente fator quimiotático e ativador de neutrófilos que desempenha um papel crucial no recrutamento seletivo e ativação de neutrófilos e no seu encaminhamento para o sulco gengival¹⁸. O aumento local da IL-8 ativa os PMN presentes (que estão em contato com a placa bacteriana) e influencia a migração seletiva de mais PMN dos vasos sanguíneos gengivais. Isso resulta num aumento do número de células num curto espaço de tempo e cria condições para a inflamação. Assim, se um aumento na IL-8 for detetado, pode indicar o estágio inicial da PI^{18,63}. De forma semelhante, a proteína **Macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP-1 α)** é um membro da subfamília β ou CC de quimiocinas que atuam como potentes células progenitoras. Estas quimiocinas causam a migração seletiva de monócitos e linfócitos para locais de inflamação e são os mediadores de várias condições fisiopatológicas¹⁸.

1.5.2 Moléculas envolvidas na remodelação dos tecidos de suporte

Um outro grupo de proteínas relevantes neste estudo, as **metaloproteinases de matriz (MMP)** representam uma superfamília estruturalmente relacionada, mas geneticamente distinta, de proteases que atuam não apenas no desenvolvimento fisiológico e remodelação de tecidos, mas também na destruição patológica de tecido inflamatório e maligno. As metaloproteinases de matriz podem ser divididas em cinco grupos principais: colagenases (MMP 1, 8 e 13); gelatinases (MMP 2 e 9); estromelinas (MMP 3, 10 e 11); metaloproteinases de matriz tipo membrana (MMP 14, 15, 16 e 17); e outras. As metaloproteinases de matriz podem degradar coletivamente quase todos os componentes da matriz extracelular e da membrana basal, e a sua atividade patológica excessiva leva à destruição dos tecidos periodontais e peri-implantares. As interações célula-célula e célula-matriz, tais como a produção de enzimas, ativadores, inibidores, citocinas e fatores de crescimento, regulam a remodelação do tecido conjuntivo e a destruição da matriz do tecido. As MMP são controladas e inibidas por inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMP), sendo que também podem processar vários substratos bioativos não matriciais, tais como citoquinas, quimiocinas, fatores de crescimento e mediadores imunitários, mediando assim processos anti-inflamatórios e pró-inflamatórios⁶⁴. Em particular a **MMP-8**, surge na literatura como um importante mediador de destruição irreversível de tecido periodontal e peri-implantar, tendo-se verificado que a sua quantificação se apresentou substancialmente elevada^{65,66}, e inclusivamente que esta decresce após implementação do tratamento⁶⁷.

Contudo, os níveis de metaloproteinases da matriz não devem ser interpretados unicamente como marcadores de destruição de tecidos, mas também como parte da defesa fisiológica ou anti-inflamatória. Em resposta ao desafio bacteriano, os leucócitos polimorfonucleares e os monócitos/macrófagos migram para os locais de inflamação e desgranulam a MMP-8 e a MMP-9. Acredita-se que um desequilíbrio entre as metaloproteinases da matriz e os inibidores teciduais destas resulte na destruição tecidual patológica observada na periodontite e PI⁶⁴.

A atividade das MMP é primariamente controlada por inibidores de tecidos, conhe-

cidos como **TIMP (Metalloproteinase inhibitor)**, que possuem um domínio N-terminal capaz de as inibir. O equilíbrio entre MMP e TIMP determina o grau de degradação de matriz extra-celular (ECM), em associação com hormonas, produtos oncogénicos, citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores de crescimento. A presença de proteínas derivadas de *P. gingivalis*, as *gingipains*, é capaz de diminuir a quantidade de TIMP-2, sugerindo que este pode ser um mecanismo patológico que promove a destruição de tecido. Neste contexto, o equilíbrio entre a atividade de MMP e TIMP, representa um aspeto crucial para a manutenção da homeostase da ECM nos tecidos moles peri-implantares, como resposta à presença de agentes patogénicos⁶⁸.

Também a **Alkaline Phosphatase (ALP)** é uma enzima envolvida no metabolismo ósseo, mais especificamente uma glicoproteína ligada à membrana, derivada de grânulos secundários ou específicos de polimorfonucleases (PMN). As bactérias gram-negativas da placa subgengival mostraram também produzir esta enzima, contudo, foi demonstrado que a maioria dos ALP mensuráveis no fluído crevicular peri-implantar é libertada por leucócitos polimorfonucleares, principalmente durante a sua migração para o local da infeção, por osteoblastos durante a formação óssea e por fibroblastos durante a regeneração periodontal. Uma vez que a ALP tem sido associada ao metabolismo ósseo, espera-se que a alteração nos seus níveis de PICF proporcione uma indicação específica do local da atividade da doença peri-implantar⁵⁵.

Outro regulador importante da remodelação óssea é a tríade **RANK/RANKL/Osteoprotegerin**. A osteoclastogénese inflamatória - padrão patológico central da PI - é mediado por mediadores pró-inflamatórios, mas é realizado em última instância pelos reguladores da osteoclastogénese⁶. A recente identificação do fator nuclear do ativador do receptor kappa-B (RANK), do seu ligando (RANKL) e da osteoprotegerin (OPG), levou a uma nova perspetiva molecular sobre a biologia osteoclástica e a homeostase óssea. Especificamente, a interação RANKL-RANK mostrou ser necessária para a diferenciação dos osteoclastos. O terceiro protagonista, OPG, atua como um antagonista do recetor solúvel para o RANKL que o impede de se ligar e ativar o RANK⁶⁹. A presença de OPG é assim absolutamente necessária para manter a massa óssea⁶⁹.

O RANK localiza-se na superfície de pré-osteoclastos e osteoclastos e torna-se ativo quer por auto-ligação quer por ligação com o RANKL. Ambos os mecanismos

são estimulados por uma concentração crítica de mediadores pró-inflamatórios e lipopolissacarídeos (LPS). Quando ativado, o RANK leva à libertação intra-citoplasmática de vários fatores de transcrição que codificam as citocinas pró-inflamatórias, o que aumenta ainda mais a atividade dos osteoclastos.

Os dados globais demonstram que a tríade OPG/RANK/RANKL constitui uma ponte molecular que abrange a homeostase óssea e a imunidade, denominada por Walsh e Choi⁷⁰ como "osteimmunology". Esta informação encontra-se esquematizada na Figura 1.3.

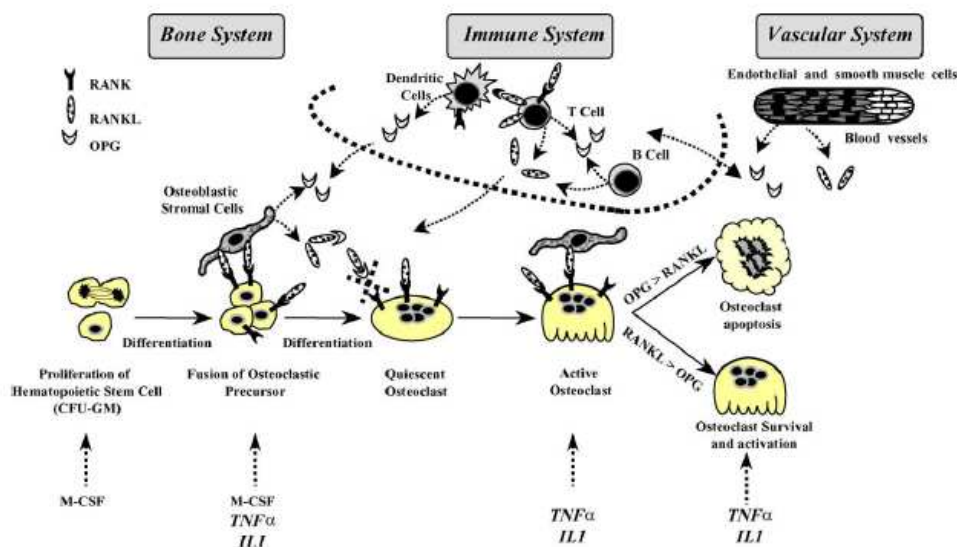


Figura 1.3: OPG/RANK/RANKL como efetores comuns dos sistemas ósseo, imunológico e vascular. Estes são produzidos seletivamente por numerosos tipos de células e uma variedade de tecidos tais como linfócitos, osteoblastos e células endoteliais. O RANKL induz fortemente osteoclastogénese e, em seguida, reabsorção óssea através de sua ligação ao RANK. A OPG inibe a osteólise e bloqueia a interação RANKL/RANK. Embora a tríade OPG/RANK/RANKL seja o principal regulador do ciclo aposição/reabsorção óssea, existem outros controlos de diferenciação osteoclastica, como TNF- α e IL-1, capazes de modular as atividades biológicas desta tríade. Imagem adaptada de Theoleyre S. et al (2004)⁶⁹.

À luz dos dados descritos acima, emergem novos tratamentos estratégicos para a perda óssea que se baseiam na compreensão do estado funcional da tríade OPG/RANK/RANKL. Foram previstas três estratégias terapêuticas, sendo que estas envolvem:

1. Citocinas e os seus recetores solúveis (moléculas recombinantes ou moléculas administradas por transferências de genes);
2. Desenvolvimento de peptídeos inibitórios;
3. Inibição específica das principais vias de sinalização⁶⁹.

O interesse terapêutico da OPG e do RANK tem sido apontado em modelos animais que imitam a patologia humana, tendo-se demonstrado que a OPG reverte a osteoporose, através da inibição de osteoclastos endosteais^{71,72}, e evita a erosão óssea na artrite⁷³ ou calcificação vascular ao bloquear um processo semelhante à osteoclastogénese^{72,74}. Neste contexto, o uso de OPG recombinante ou outras moléculas capazes de bloquear a interação entre RANKL e RANK é de grande interesse⁶⁹.

Os osteoclastos ativados expressam **cathepsin-K**, a única cisteína-protease lisossómica com capacidade para degradar a matriz óssea incluindo colagénio tipo 1, osteopontina e osteonectina sob pH ácido. A presença desta enzima, portanto, é considerada um marcador altamente específico de reabsorção óssea ativa e atividade osteoclástica⁶. A **sclerostin** - uma proteína expressa por células envolvidas no metabolismo ósseo, como osteócitos, condrócitos hipertróficos mineralizados e cementócitos - é considerada um biomarcador que regula negativamente a formação óssea ao reduzir o conteúdo mineral do osso, tanto ao nível da quantidade de osso trabecular como da espessura do córtex, antagonizando as proteínas morfogénicas ósseas. A **sclerostin** é relatada como sendo regulada por citocinas pró-inflamatórias, bem como por carga excessiva. Com base nestes factos, esta proteína também pode servir como um indicador de PI, não só pela presença de inflamação crónica, mas também devido à presença de forças biomecânicas inadequadas⁶.

Por fim, sabemos ainda que a angiogénese é crítica para o desenvolvimento, remodelação e cicatrização do osso. O **vascular endothelial growth factor A (VEGF)** é uma glicoproteína que induz a proliferação de células endoteliais, a angiogénese e a permeabilidade capilar, mas também estimula a migração de monócitos/macrófagos e participa na diferenciação das células ósseas^{75,76}. Deste modo, esta molécula pode ser utilizada como um marcador destes processos no contexto das doenças peri-implantares.

1.6 Objetivos

O presente trabalho de investigação pretende contribuir para o estudo e clarificação dos mecanismos moleculares envolvidos na peri-implantite, através da anotação e análise de dados moleculares de amostras recolhidas na cavidade oral. Desta forma, os objetivos primários desta dissertação são:

- A atualização da informação molecular em peri-implantite e anotação da informação na base de dados OralOme;
- Identificação de proteínas que contribuam para o esclarecimento dos mecanismos moleculares com importância no estabelecimento e progressão da doença.

Subsequentemente, espera-se que o conhecimento gerado nesta dissertação possa contribuir para a identificação de moléculas que possibilitem:

- O diagnóstico precoce;
- A determinação da suscetibilidade do doente;
- A determinação do prognóstico dos implantes afetados, através da identificação de biomarcadores específicos envolvidos no início e progressão da doença;
- Ajudar a orientar abordagens de tratamento personalizadas para cada indivíduo;
- Avaliar o sucesso da terapêutica.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

De forma a responder aos objetivos traçados para este trabalho, seguiram-se as metodologias apresentadas abaixo e resumidas na Figura 2.1.

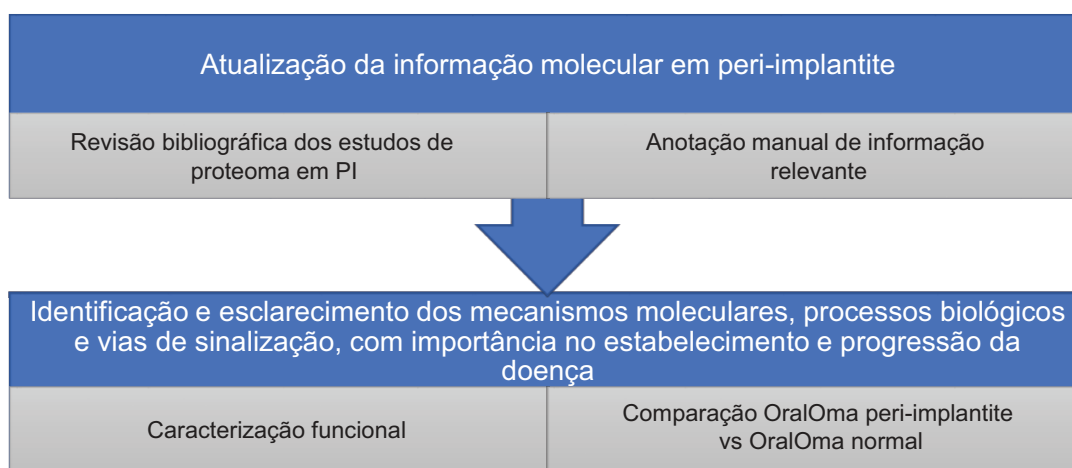


Figura 2.1: Esquematização dos objetivos traçados e da metodologia seguida para os alcançar.

2.1 Estratégias de Pesquisa

Numa primeira fase foi realizada uma pesquisa bibliográfica com recurso às ferramentas de pesquisa avançada PubMed, WOS e Google Scholar, tendo-se utilizado termos Mesh e outras palavras-chave: “*peri-implantitis and biomarkers*”, “*peri-implantitis and proteins*”, “*dental implant failure and proteome*”, “*dental implant failure and biomarkers*”, “*bone diseases and proteins*”, “*dental implants and bone diseases*”. Foram utilizados os filtros de pesquisa “*Humans*” e “*Publication dates*”, tendo sido o primeiro responsável por incluir exclusivamente artigos com resultados experimentais referentes à espécie *Homo Sapiens*, enquanto um intervalo de tempo de vinte e quatro anos, foi empregue no segundo – de 01/01/1992 a 31/12/2016, por forma a abranger todos

os estudos de proteômica realizados sobre peri-implantite (PI).

A seleção de artigos a analisar incluiu resultados onde são identificadas proteínas alteradas em PI, principalmente quando comparadas com grupos de controlo com implantes saudáveis, mas também com grupos de controlo com periodontite e grupos de pacientes após implementação do tratamento (terapia não cirúrgica). Por outro lado, foram excluídos os artigos em que é feita a quantificação de proteínas apenas em implantes saudáveis e não em PI, e artigos referentes a polimorfismos, sem a respetiva quantificação de proteínas alteradas.

2.2 Anotação manual dos dados relativos às proteínas presentes e alteradas em Peri-implantite

A pesquisa foi realizada com vista ao levantamento, na literatura disponível até à data, das proteínas identificadas com alterações em PI e à sua inserção na base de dados do proteoma salivar – o OralOma⁷⁷. Esta consiste numa base de dados resultante da compilação de diversos proteoma da cavidade oral, a qual pode ser consultada através do portal *Web OralCard*⁴⁹ e que atualmente está em fase de migração para a *SalivaTecDB*. O *OralCard* é uma ferramenta bioinformática dedicada à investigação científica em saúde oral. Este permite analisar e integrar os dados de proteomas orais, contribuindo para a elucidação da biologia oral e para o planeamento de estratégias com vista à identificação de biomarcadores de patologias orais e sistémicas. Esta catalogação assume particular importância dada a vasta quantidade e heterogeneidade da informação disponível na bibliografia, pelo que as proteínas devem ser catalogadas de forma rigorosa e sistemática, por forma a promover uma correta compreensão por parte de toda a comunidade científica. Assim sendo, procedeu-se à anotação manual destas proteínas com recurso ao *software* Microsoft Office Excel 2013, com o preenchimento de uma tabela com diversos parâmetros. Durante esta anotação, houve necessidade de se acrescentar novas colunas ao ficheiro, tais como: "*Gene Name*" para facilitar a identificação das proteínas catalogadas e "*Control*", "*Condition*" e "*Quantification Unit*", com o intuito de aferir as alterações em saúde e doença, bem como as unidades utilizadas, para verificar se é possível extrapolar os dados e tirar conclusões. Estes últimos foram inseridos não só para as novas proteínas catalo-

gadas, mas também para as previamente existentes, tendo sido feita uma revisão de toda a informação contida no OralOma da PI. Todos os parâmetros contidos nesta são apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Cabeçalhos que permitem a organização da informação recolhida através de estudos de proteómica da cavidade oral (proteínas identificadas na PI anotadas manualmente) numa tabela Microsoft Excel 2013.

UniProtKB AC	Whole Saliva	Control	Methods of Analysis
Name	Crevicular Fluid	Condition	Type of Study
Gene Name	Mucosa	Quantification Unit	PTM
Organism	Tongue	Regulation	Biomarker
Parotid	In Vitro	Age group	Citation (NCBI ID)
Parotid Exosome	Health	Gender	Obs.
SM/SL	Disease	Social Habits	
Minor	Disease (MeSH ID)	Methods of Sampling	

Seguidamente serão apresentados com maior detalhe os parâmetros avaliados para a construção da base de dados referida previamente.

2.2.1 Identificação da proteína

Os campos presentes na Tabela 2.2 pretendem proceder à identificação da proteína, fornecendo o seu código UniProtKB AC, o nome que lhe corresponde e ao seu gene, bem como o organismo no qual está presente, obtidos através da base de dados *UniProt (Universal Protein Resource)*⁷⁸.

Tabela 2.2: Cabeçalhos da tabela Microsoft Excel 2013 relativos à identificação das proteínas da PI anotadas manualmente

UniProtKB AC
Name
Gene Name
Organism

Esta ferramenta bioinformática é uma iniciativa do SIB (*Swiss Institute of Bioin-*

formatics), do EBI (*European Bioinformatics Institute*) e do PIR (*Protein Information Resource*), e tem como propósito providenciar um repositório de proteínas e suas informações funcionais^{78,79}. Desta forma, as proteínas em causa são reconhecidas de forma universal.

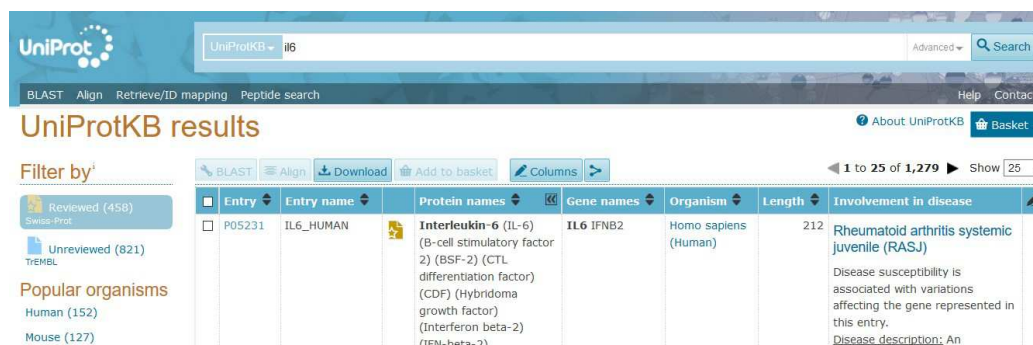


Figura 2.2: Exemplo ilustrativo da visualização do site da Uniprot durante a atribuição do código UniProtKB AC, nome, nome do gene e organismo a uma determinada proteína.

2.2.2 Proveniência da amostra

As amostras para estudo e quantificação das proteínas presentes em PI podem ter proveniências distintas, sendo crucial a identificação de cada uma delas. Entre as possíveis origens da amostra podemos destacar as glândulas parótidas, o exossoma das glândula parótidas, as glândulas mandibulares ou sublinguais, as glândulas salivares minor, a saliva total, o líquido crevicular, a mucosa oral e a língua, tendo sido encontrados apenas na bibliografia disponível resultados para a parótida, saliva total, líquido crevicular e mucosa (ver Tabela 2.3).

Tabela 2.3: Cabeçalhos da tabela Microsoft Excel 2013 relativos à proveniência das proteínas da PI anotadas manualmente.

Parotid	Whole Saliva
Crevicular Fluid	Mucosa

2.2.3 Relação com os estados de saúde e doença

Os campos seguintes (ver Tabela 2.4) permitem-nos aferir acerca da presença ou ausência em saúde das proteínas identificadas e determina a doença em estudo -

sendo que neste caso esta corresponde sempre a PI - assim como o seu código de identificação. Posto isto, anotou-se o código MeSH (*Medical Subject Headings*) da doença e o nome da doença em estudo (*Condition Name*).

Tabela 2.4: Cabeçalhos da tabela Microsoft Excel 2013 relativos à relação das proteínas da PI anotadas com os estados de saúde e doença.

Health	Control
Disease (OMIM ID)	Condition
Disease (MeSH ID)	Quantification Unit
	Regulation

Os parâmetros *control*, *condition*, e *quantification unit* representam as quantidades de cada proteína nos estados de saúde e PI, bem como as unidades utilizadas, respetivamente. No que concerne à regulação, este campo permite-nos obter a relação entre a quantificação das proteínas no estado de doença, comparativamente com os valores obtidos na amostra dos controlos saudáveis, facilitando assim a interpretação das alterações moleculares observadas. Com vista à quantificação das alterações verificadas recorreu-se ao cálculo do *Fold change*, como apresentado abaixo:

$$\text{Fold change} = \frac{\text{Número de ocorrências na doença}}{\text{Número de ocorrências no controlo}} = x$$

Posto isto, poderão verificar-se um destes dois acontecimentos:

- Acontecimento a): $x \geq 1$, significa que a regulação é positiva.
- Acontecimento b): $0 < x < 1$, significa que a regulação é negativa.

No caso do acontecimento a) a interpretação é simples, as proteínas presentes em PI estão aumentadas em relação ao controlo de indivíduos saudáveis. Por outro lado, para o acontecimento b) é necessário realizar o seguinte quociente para que se obtenha uma regulação com valor negativo:

$$\text{Fold change} = -\frac{1}{x}$$

Por outras palavras, quando o valor da regulação é inferior a 1, temos que dividir -1 por esse valor, sendo que o resultado obtido é o número de vezes que a proteína em causa se encontra diminuída em doença. Dando um exemplo prático, se tivermos um *Fold change* de 0.5, significa que esta proteína se encontra diminuída 2 vezes na doença em relação ao estado saudável, anotando-se o valor -2.

2.2.4 Caracterização dos indivíduos da amostra

Os parâmetros presentes na Tabela 2.5 permitem-nos caracterizar os indivíduos da amostra no que concerne à sua faixa etária, género e hábitos sociais, nomeadamente se esta integra indivíduos fumadores, não fumadores ou ambos. É importante aferir estes dados pois características distintas nos vários grupos podem ser responsáveis pela modificação da expressão das proteínas avaliadas.

Tabela 2.5: Cabeçalhos da tabela Microsoft Excel 2013 relativos à caracterização dos indivíduos dadores da amostra.

Age group
Gender
Social Habits

2.2.5 Métodos de recolha e análise da amostra

As metodologias de recolha, identificação e análise de proteínas utilizadas em cada estudo poderão também influenciar os resultados obtidos e a interpretação dos mesmos, pelo que também estes foram anotados (ver Tabela 2.6).

Tabela 2.6: Cabeçalhos da tabela Microsoft Excel 2013 referentes aos métodos de recolha e análise das amostras.

Methods of Sampling
Methods of Analysis

2.2.6 Caracterização do estudo

Foi registado igualmente o tipo de estudo em análise e o seu NCBI ID (ver Tabela 2.7), ou seja, o código do *PubMed* que é único para cada artigo e que permite a sua identificação. Quanto ao tipo de estudo, este pode ser proteómico ou não-proteómico: o primeiro tipo envolve a análise em larga escala de todas as proteínas presentes numa dada amostra, bem como a sua quantificação; por outro lado, os estudos de não-proteómica são dirigidos, ou seja, os alvos são previamente selecionados através da utilização de anticorpos, por exemplo, que se irão ligar seletivamente às proteínas acerca das quais pretendemos obter informações.

Tabela 2.7: Cabeçalhos da tabela Microsoft Excel 2013 relativos à caracterização dos estudos analisados.

Type of Study
Citation (NCBI ID)

2.2.7 Outras informações

Por fim, foram ainda inseridas informações acerca da presença de modificações pós-tradução nas proteínas identificadas, como por exemplo, glicosilação, fosforilação ou metilação, e se estas foram propostas como biomarcadores pelo autor no estudo em questão (ver Tabela 2.8).

Tabela 2.8: Cabeçalhos da tabela Microsoft Excel 2013 relativos às características especiais das proteínas da PI.

PTM
Biomarker

2.3 Análise da proveniência das amostras

De um modo geral, a saliva tem sido o fluído oral mais utilizado para obter informação molecular. Contudo, no estudo da PI é utilizado mais frequentemente o fluído crevi-

cular em detrimento da saliva total e em alguns casos a mucosa peri-implantar. Com o intuito de analisar e comparar a representatividade molecular em cada um destes tipos de amostra, recorreu-se ao programa Venny⁸⁰, utilizando os códigos UniProtKB AC do conjunto de proteínas para cada origem de amostra.

2.4 Caracterização funcional

Com vista à compreensão e identificação os processos biológicos, funções moleculares e vias de sinalização nas quais participam as proteínas envolvidas em PI, foi realizada uma caracterização funcional utilizando a ferramenta PANTHER.

2.4.1 PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships)

As proteínas previamente catalogadas no SalivaTecDB foram classificadas segundo ontologias génicas, sendo que para tal, se recorreu à ferramenta *online* PANTHER (<http://pantherdb.org/>). Esta foi projetada para classificar as proteínas (e os seus genes) a fim de facilitar a análise de alto rendimento, e permite classificar as proteínas de acordo com:

- Família e sub-família: a primeira consiste num grupo de proteínas evolutivamente relacionadas, sendo que na segunda estas também têm a mesma função;
- Função molecular: a função da própria proteína ou a sua interação direta com outras proteínas a um nível bioquímico (ex: proteína quinase);
- Processo biológico: a função da proteína no contexto de uma rede mais complexa de proteínas, que interagem para realizar um processo ao nível da célula ou do organismo (ex: mitose);
- Vias de sinalização: semelhante ao processo biológico, mas este também especifica as relações entre as moléculas que interagem^{81,82}.

Para esta caracterização foram inseridos todos os códigos *UniProtKB* das proteínas selecionadas no campo “*Enter IDs*” e selecionada a espécie *Homo Sapiens* no campo “*Select organisms*”, bem como a opção “*Functional classification viewed in pie chart*”

no campo “*Select Analysis*”, de acordo com a Figura 2.3. De seguida, é escolhido o tipo de classificação que pretendemos realizar, segundo funções moleculares, processos biológicos ou vias de sinalização.

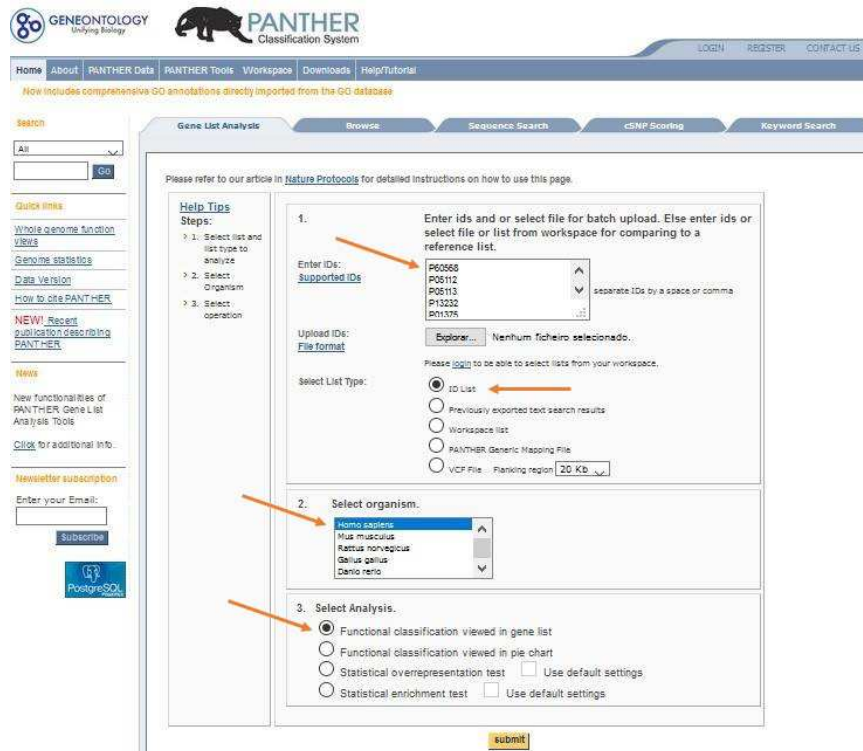


Figura 2.3: Exemplo ilustrativo da visualização do site da Uniprot durante a atribuição do código UniProtKB AC, nome, nome do gene e organismo a uma determinada proteína.

2.5 Comparação com o OralOma normal – Diferença fracional

Após a caracterização funcional das proteínas previamente catalogadas, estas foram comparadas com uma lista de referência – o OralOma normal. Este consiste num conjunto de proteínas identificadas em pacientes saudáveis e foi obtida através do portal Web OralCard (<http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/>). Para a realização desta comparação foram efetuadas as seguintes etapas:

- Cada lista de proteínas de PI classificada segundo a função molecular, processo biológico e vias de sinalização, foi comparada com a lista de referência;
- Por cálculo de proporção direta, inferiu-se o valor expectável para cada uma das categorias;

- Recorreu-se à fórmula $DF = (\alpha - \beta) / \beta$ para quantificar a diferença entre os valores observados e os esperados, em que o DF corresponde à diferença fracional, α ao valor observado e β ao valor esperado;
- Por fim, recorreu-se a um teste binomial descrito por Cho e Campbell, *TIGS* em 2000⁸³, para determinar se o resultado obtido é estatisticamente significativo. Este é assim considerado quando $p \leq 0.05$, sendo que quanto menor o *p-value*, menor será a probabilidade do resultado ser devido à aleatoriedade.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1 Catalogação das proteínas

3.1.1 Atualização do OralOma

A estratégia de pesquisa apresentada na Secção 2.1, resultou na identificação de 76 artigos, 43 dos quais tinham dados relevantes para este estudo. Assim sendo, foi possível a atualização da componente peri-implantite (PI) da base de dados Saliva-TecDB, tendo sido anotadas manualmente 58 novas proteínas, juntando-se às 38 já existentes, perfazendo um total de 96 proteínas.

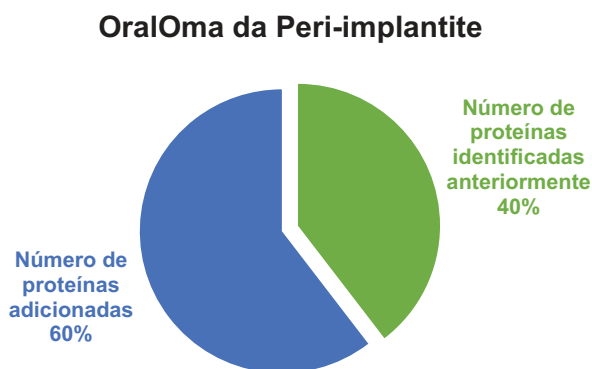


Figura 3.1: Número de proteínas introduzidas neste trabalho comparativamente com o número de proteínas previamente inseridas.

Todas as proteínas catalogadas apresentam dados de quantificação, inclusive as já existentes, tendo sido sujeitas a revisão e adicionados os parâmetros em falta. Contudo, não existe homogeneidade quanto às unidades utilizadas nos diversos estudos, o que limita a interpretação e dedução de conclusões, não sendo possível avaliar de forma rigorosa as diferenças entre grupos de indivíduos que apresentam implantes saudáveis e com PI, bem como a legitimidade destas proteínas enquanto possíveis

biomarcadores.

As proteínas que constituem a base de dados do SalivaTecDB para a PI são apresentadas nas Tabelas 3.1-3.6. Os asteriscos representam as proteínas que foram propostas como possíveis biomarcadores pelo respetivo autor e os códigos UniProtKB AC que se encontram sublinhados, representam as proteínas que foram acrescentadas após este trabalho de investigação.

Tabela 3.1: Total de proteínas identificadas na base de dados SalivaTecDB para a PI, até à data da presente dissertação.

UniProtKB AC	Nome	Origem	Regulação	Referência
P05186	Alkaline phosphatase	Fluído Crevicular	5.90	Plagnat D et al (2002) ^{55*}
			2.84	Malik N et al (2015) ^{10*}
P01023	Alpha 2-macroglobulin	Fluído Crevicular	8.10	Plagnat D et al (2002) ⁵⁵
P08246	Neutrophil Elastase	Fluído Crevicular	12.80	Plagnat D et al (2002) ^{55*}
P02818	Osteocalcin	Fluído Crevicular	1.10	Murata M. et al (2002) ^{48*}
			1.50	Tümer C et al (2008) ⁸⁴
P01584	Interleukin-1 Beta	Fluído Crevicular	0.17	Murata M et al (2002) ⁴⁸
			135.30	Petković AB et al (2010) ¹⁸
			95.48	Luo L et al (2011) ⁸⁵
			1.52	Zani SR et al (2016) ⁴
			3.05	Wang HL et al (2016) ^{86*}
			6.52	Casado PL et al (2013) ^{60*}
			1.51	Lachmann S et al (2007) ⁸⁷
			46.88	Aboyoussef H at al (1998) ^{88*}
		7.71	Panagakos FS et al (1996) ⁸⁹	
	Saliva Total	↑	Laine ML et al (2006) ⁹⁰	
P22894	Neutrophil collagenase (MMP8)	Fluído Crevicular	↑	Kivelä-Rajamäki MJ et al (2003) ⁹¹
			9.70	Kivelä-Rajamäki M et al (2003) ⁹²
			↑	Arakawa H et al (2012) ^{93*}
		-1.01	Wang HL et al (2016) ⁸⁶	
	Mucosa		Borsani E et al (2005) ⁹⁴	
Q13753	Laminin subunit gamma 2	Fluído Crevicular	↑	Kivelä-Rajamäki MJ et al (2003) ⁹¹
P09237	Matrylisin 1 (MMP-7)	Fluído Crevicular	11.30	Kivelä-Rajamäki M et al (2003) ⁹²
P14780	Matrix Metalloproteinase-9	Fluído Crevicular	↑	Ma J et al (2003) ⁹⁵
			10.34	Özçakır-Tomruk C et al (2012) ⁹⁶
				Aboyoussef H at al (1998) ⁸⁸

Tabela 3.2: Total de proteínas identificadas na base de dados SalivaTecDB para a PI, até à data da presente dissertação (continuação).

UniProtKB AC	Nome	Origem	Regulação	Referência
P05164	Myeloperoxidase	Fluído Crevicular	14.447	Liskmann S et al (2004) ^{97*}
			4.33	Malik N et al (2015) ^{10*}
P43235	Cathepsin K	Fluído Crevicular	2.21	Strbac GD et al (2006) ⁹⁸
			2.98	Yamalik N et al (2011) ⁹⁹
			2.32	Rakic M et al (2014) ⁶
			4.48	Yamalik N et al (2012) ^{100*}
P01583	Interleukin-1 Alpha	Saliva Total	↑	Laine ML et al (2006) ⁹⁰
P18510	Interleukin-1 receptor antagonist protein	Saliva Total	↑	Laine ML et al (2006) ⁹⁰
		Fluído Crevicular	1.09	Zani SR et al (2016) ^{4*}
P60022	Beta Defensin-1	Fluído Crevicular	↑	Kuula H et al (2008) ¹⁰¹
Q9NPA2	Matrix metalloproteinase-25	Fluído Crevicular	↑	Kuula H et al (2008) ¹⁰¹
Q9NRE1	Matrix metalloproteinase-26	Fluído Crevicular	↑	Kuula H et al (2008) ¹⁰¹
P02458	Collagen alpha-1 (II) chain (C-telopeptide Pyridinoline)	Fluído Crevicular	1.10	Tümer C et al (2008) ⁸⁴
O00300	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B (Osteoprotegerin)	Mucosa	-3.22	Duarte PM et al (2009) ¹⁰²
		Fluído Crevicular	1.19	Rakic M et al (2013) ^{103*}
			1.68	Wang HL et al (2016) ⁸⁶
			1.19	Rakic M et al (2014) ^{6*}
			40.08	Arikan F et al (2008) ^{104*}
			-2.14	Arikan F et al (2008) ^{105*}
			-1.47	Duarte PM et al (2009) ¹⁰⁶
P05112	Interleukin-4	Mucosa	-2.44	Duarte PM et al (2009) ¹⁰²
		Fluído Crevicular		Duarte PM et al (2009) ¹⁰⁶
O14788	Tumor Necrosis factor ligand superfamily member 11 (RANKL)	Mucosa	23.50	Duarte PM et al (2009) ¹⁰²
		Fluído Crevicular	1.77	Rakic M et al (2013) ^{103*}
			1.79	Rakic M et al (2013) ^{6*}
			1.00	Arikan F et al (2008) ¹⁰⁴
				Monov G et al (2006) ¹⁰⁷
				Arikan F et al (2011) ^{105*}
				Duarte PM et al (2009) ¹⁰⁶
P29459	Interleukin-12	Mucosa	7.35	Duarte PM et al (2009) ¹⁰²

Tabela 3.3: Total de proteínas identificadas na base de dados SalivaTecDB para a PI, até à data da presente dissertação (continuação).

UniProtKB AC	Nome	Origem	Regulação	Referência
P01375	Tumor factor necrosis (TNF-Alpha)	Mucosa	4.83	Duarte PM et al (2009) ¹⁰²
			4.00	Venza I et al (2010) ^{108*}
		Fluído Crevicular	163.00	Petković AB et al (2010) ¹⁸
			3.67	Luo L et al (2011) ⁸⁵
			2.48	Duarte PM et al (2009) ^{102*}
1.68	Zani SR et al (2016) ^{4*}			
P22301	Interleukin-10 (IL-10)	Mucosa	3.50	Duarte PM et al (2009) ¹⁰⁶
		Saliva Total	2.14	Liskmann S et al (2006) ^{109*}
				Duarte PM et al (2009) ¹⁰⁶
		Fluído Crevicular	-2.17	Casado PL et al (2013) ^{60*}
			1.23	Zani SR et al (2016) ^{4*}
-5.88	Severino VO et al (2011) ¹¹⁰			
P10147	C-C motif chemokine 3 (Macrophage inflammatory protein 1-alpha)	Fluído Crevicular	18.35	Petković AB et al (2010) ¹⁸
P10145	Interleukin-8 (IL-8)	Mucosa	7.60	Venza I et al (2010) ¹⁰⁸
			34.90	Petković AB et al (2010) ¹⁸
		Fluído Crevicular	5.00	Severino VO et al (2011) ¹¹⁰
			42.43	Luo L et al (2011) ⁸⁵
P05231	Interleukin-6	Saliva Total	11.10	Liskmann S et al (2006) ^{109*}
		Mucosa	6.45	Venza I et al (2010) ¹⁰⁸
		Fluído Crevicular	2.00	Severino VO et al (2011) ¹¹⁰
			67.30	Luo L et al (2011) ⁸⁵
			1.70	Zani SR et al (2016) ⁴
Q5QEX9	Interleukin-17	Fluído Crevicular	2.50	Severino VO et al (2011) ¹¹⁰
P24821	Tenascin-C	Fluído Crevicular	5.00	Özçakır-Tomruk C et al (2012) ^{96*}
		Mucosa	1.92	Borsani E et al (2005) ^{94*}
P05204	Nom-histone chromosomal protein HMG-17	Fluído Crevicular	↑	Luo L et al (2011) ⁸⁵
P09429	High mobility group protein B1 (HMG-1)	Fluído Crevicular	46.26	Luo L et al (2011) ⁸⁵

Tabela 3.4: Total de proteínas identificadas na base de dados SalivaTecDB para a PI, até à data da presente dissertação (continuação).

UniProtKB AC	Nome	Origem	Regulação	Referência
Q9Y6Q6	TNF receptor superfamily member 11A (RANK)	Fluído Crevicular	2.73	Rakic M et al (2013) ^{103*}
			2.98	Rakic M et al (2014) ⁶
Q9BQB4	Sclerostin	Fluído Crevicular	17.97	Rakic M et al (2014) ^{6*}
Q8N6P7	Interleukin 22 receptor	Mucosa	2.99	Luo Z et al (2013) ¹¹¹
Q9GZX6	Interleukin 22	Mucosa	5.49	Luo Z et al (2013) ¹¹¹
Q9NPF7	Interleukin 23	Mucosa	10.99	Luo Z et al (2013) ¹¹¹
P09038	Fibroblast growth factor 2	Fluído Crevicular	1.17	Zani SR et al (2016) ⁴
P51671	Eotaxin	Fluído Crevicular	1.44	Zani SR et al (2016) ⁴
P49771	Fms-related tyrosine kinase 3 ligand (Flt3 ligand) (Flt3L) (SL cytokine)	Fluído Crevicular	1.14	Zani SR et al (2016) ⁴
P04141	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Fluído Crevicular	1.88	Zani SR et al (2016) ⁶⁷
Q7Z7Q8	C-C motif chemokine	Fluído Crevicular	1.21	Zani SR et al (2016) ⁴
P29460	Interleukin-12 subunit beta (IL-12B)	Fluído Crevicular	1.52	Zani SR et al (2016) ⁴ Duarte PM et al (2009) ¹⁰⁶
Q14676	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1	Fluído Crevicular	1.15	Zani SR et al (2016) ⁴
P35225	Interleukin-13 (IL-13)	Fluído Crevicular	1.41	Zani SR et al (2016) ⁴
Q16527	Cysteine and glycine-rich protein 2 (CRP2)	Fluído Crevicular	1.31	Zani SR et al (2016) ⁴
P40933	Interleukin-15 (IL-15)	Fluído Crevicular	1.40	Zani SR et al (2016) ⁴
P29965	CD40 ligand	Fluído Crevicular	1.31	Zani SR et al (2016) ⁴ *
Q16552	Interleukin-17A (IL-17A)	Fluído Crevicular	1.85	Zani SR et al (2016) ⁴⁴ *
P60568	Interleukin-2 (IL-2)	Fluído Crevicular	1.70	Zani SR et al (2016) ⁴ *
P15692	Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)	Fluído Crevicular	1.07	Zani SR et al (2016) ⁴ *
			2,18	Wang HL et al (2016) ^{86*}
		Mucosa	1.21	Bullon P et al (2004) ¹¹²
P16035	Metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP-2)	Fluído Crevicular	1.78	Wang HL et al (2016) ⁸⁶ *

Tabela 3.5: Total de proteínas identificadas na base de dados SalivaTecDB para a PI, até à data da presente dissertação (continuação).

UniProtKB AC	Nome	Origem	Regulação	Referência
P13500	C-C motif chemokine 2 (MCP-1)	Mucosa	3.93	Venza I et al (2010) ¹⁰⁸
P25024	C-X-C chemokine receptor type 1 (CXCR-1) (IL-8 receptor type 1)	Mucosa		Venza I et al (2010) ¹⁰⁸
P32246	C-C chemokine receptor type 1 (CCR-1)	Mucosa		Venza I et al (2010) ¹⁰⁸
P41597	C-C chemokine receptor type (CCR-2)	Mucosa	3.08	Venza I et al (2010) ¹⁰⁸
P51677	C-C chemokine receptor type 3 (CCR3)	Mucosa		Venza I et al (2010) ¹⁰⁸
P51679	C-C chemokine receptor type 4 (CCR-4)	Mucosa	3.40	Venza I et al (2010) ¹⁰⁸
P51681	C-C chemokine receptor type 5 (CCR-5)	Mucosa	3.38	Venza I et al (2010) ¹⁰⁸ *
P25025	C-X-C chemokine receptor type 2 (CXCR-2)	Mucosa		Venza I et al (2010) ¹⁰⁸
P49682	C-X-C chemokine receptor type 3 (CXCR-3)	Mucosa	3.47	Venza I et al (2010) ¹⁰⁸ *
P05120	Plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2)	Fluído Crevicular	-4.76	Lachmann S et al (2007) ⁸⁷
P04792	Heat shock protein beta-1 (HspB1)	Mucosa	↑	Borsani E et al (2007) ¹¹³ *
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSP-60)	Mucosa	↑	Borsani E et al (2007) ¹¹³ *
P09601	Heme oxygenase 1 (HSP 32)	Mucosa	↓	Borsani E et al (2007) ¹¹³
P02452	Collagen alpha-1(I) chain (Alpha-1 type I collagen)	Mucosa		Borsani E et al (2005) ⁹⁴
P02461	Collagen alpha-1(III) chain	Mucosa		Borsani E et al (2005) ⁹⁴

Tabela 3.6: Total de proteínas identificadas na base de dados SalivaTecDB para a PI, até à data da presente dissertação (continuação).

UniProtKB AC	Nome	Origem	Regulação	Referência
P02462	Collagen alpha-1(IV) chain	Mucosa		Borsani E et al (2005) ⁹⁴
P20908	Collagen alpha-1(V) chain	Mucosa	3.64	Borsani E et al (2005) ⁹⁴ *
P03956	Interstitial collagenase (MMP-1)	Mucosa		Borsani E et al (2005) ⁹⁴
P08254	Stromelysin-1 (MMP-3)	Mucosa		Borsani E et al (2005) ⁹⁴
P45452	Collagenase 3 (MMP-13)	Mucosa	14.00	Borsani E et al (2005) ⁹⁴ *
P01033	Metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP-1)	Mucosa		Borsani E et al (2005) ⁹⁴
P11836	B-lymphocyte antigen CD20	Mucosa	7.31	Bullon P et al (2004) ¹¹²
P09693	T-cell surface glycoprotein CD3 gamma chain	Mucosa	12.36	Bullon P et al (2004) ¹¹²
P06126	T-cell surface glycoprotein CD1a	Mucosa		Bullon P et al (2004) ¹¹²
Q86YT6	E3 ubiquitin-protein ligase MIB1	Mucosa	1.80	Bullon P et al (2004) ¹¹²
P28906	Hematopoietic progenitor cell antigen CD34	Mucosa	1.83	Bullon P et al (2004) ¹¹²
P00451	Coagulation factor VIII	Mucosa	1.63	Bullon P et al (2004) ¹¹²
P10415	Apoptosis regulator Bcl-2	Mucosa		Bullon P et al (2004) ¹¹²
P04637	Cellular tumor antigen p53 (Tumor suppressor p53)	Mucosa		Bullon P et al (2004) ¹¹²
P08236	Beta-glucuronidase	Fluído Crevicular		Schubert U et al (2001) ¹¹⁴ *
P08253	72 kDa type IV collagenase (MMP-2)	Fluído Crevicular		Aboyoussef H et al (1998) ⁸⁸

3.1.2 Origem das proteínas identificadas

No conjunto das 96 proteínas identificadas em PI, 46 foram identificadas em fluído crevicular, 43 em gengiva e 15 em saliva total. Verificou-se que 32 das proteínas identificadas são exclusivas do fluído crevicular, 33 da gengiva e apenas 4 da saliva total. Apurou-se ainda que o fluído crevicular apresenta 6 proteínas em comum com a saliva total, 5 com a gengiva e ainda existem 5 identificadas nas três proveniências.

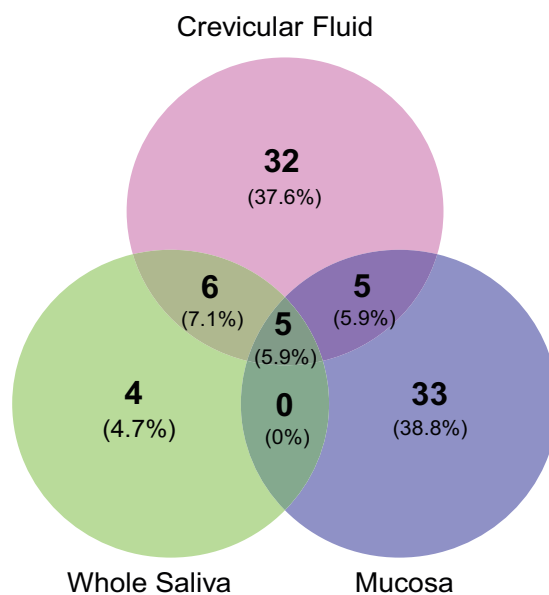


Figura 3.2: Diagrama de Venn obtido pelo programa Venny, representando a proveniência das proteínas catalogadas.

Tendo em conta estes resultados, verificámos que o fluído crevicular e a gengiva apresentaram um maior número de proteínas relacionadas com a PI, em detrimento da saliva total. Contudo, iremos debruçar-nos essencialmente sobre os resultados obtidos para o fluído crevicular e saliva total, pelo facto de permitirem uma metodologia de recolha simples e não-invasiva, contrariamente às amostras de gengiva que requerem necessariamente a realização de uma biópsia. As proteínas com origem no fluído crevicular assumem particular importância, uma vez que este parece constituir um meio fidedigno para a deteção precoce de alterações que possam indiciar a instalação da doença, pois apresenta uma boa relação especificidade-sítio das amostras⁴.

3.1.3 Relação com os estados de saúde e doença

No conjunto das 96 proteínas identificadas em PI, nenhuma destas se revelou exclusiva desta patologia, estando também presentes no estado saudável, podendo estar sobre ou sub-reguladas.

Através da análise das Tabelas 3.1-3.6, é possível reter que algumas proteínas foram identificadas em diferentes estudos, tal como é o caso de: *Alkaline phosphatase*, *Osteocalcin*, *Interleukin-1 Beta*, *Neutrophil collagenase (MMP8)*, *Matrix Metalloproteinase-9*, *Myeloperoxidase*, *Cathepsin K*, *Interleukin-1 receptor antagonist protein*, *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B (Osteoprotegerin - OPG)*,

Interleukin-4, *Tumor Necrosis factor ligand superfamily member 11* (RANKL), *Tumor factor necrosis* (TNF- α), *Interleukin-10* (IL-10), *Interleukin-8* (IL-8), *Interleukin-6*, *Tenascin-C*, *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A* (RANK) e *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A). O facto de estas moléculas terem sido identificadas em vários estudos, poderá demonstrar uma maior evidência da relação de alterações destas com a PI.

Com base na quantificação obtida pelos estudos experimentais que identificaram as proteínas referidas em PI, foi calculada a regulação (*Fold change*). Este valor permite-nos quantificar a variação de cada proteína na doença em relação ao controlo saudável, facilitando deste modo a interpretação das alterações moleculares evidenciadas entre os dois estados. Para melhor entendimento destes resultados irão ser abordadas individualmente as proteínas com alterações na regulação que considerámos relevante na etiologia da PI:

- ***Myeloperoxidase (MPO)***: esta proteína apresentou regulação positiva, ou seja, a sua quantificação estava aumentada em PI (14.4 e 4.3). Trata-se de uma hemoproteína, que ao reagir com o peróxido de hidrogénio origina a sua conversão em radicais livres e substâncias oxidantes com atividade bactericida. O aumento desta proteína em PI é coerente com o facto de esta patologia ser de natureza infecciosa, induzindo assim a resposta inflamatória primária, através do destacamento de neutrófilos polimorfonucleares e consequente produção de MPO^{61, 62, 97}. Adicionalmente, o aumento da atividade da MPO em tecidos acometidos por periodontite e o seu decréscimo após tratamento, são argumentos que suportam o papel desta proteína nas doenças de cariz periodontal¹⁰.
- ***Alkaline Phosphatase (ALP)***: esta glicoproteína, como já referido anteriormente, tem sido associada ao metabolismo ósseo, sendo libertada por leucócitos polimorfonucleares, osteoblastos e fibroblastos. Assim sendo, e em concordância com os fenómenos que sabemos ocorrerem em PI, a sobre-regulação desta enzima (5.9 e 2.84) é um bom indicador de doença peri-implantar^{10, 55}.
- ***Neutrophil Elastase (ELANE)***: na bibliografia analisada, a elastase aparece aumentada em PI cerca de 13 vezes em relação a implantes saudáveis, o que coaduna com o facto de esta estar fortemente associada a eventos de lesão

tecidual⁵⁵ .

- **Citocinas Pró-inflamatórias:** citocinas pró-inflamatórias, como é o caso da **Interleukin-1 β** , têm sido encontradas significativamente alteradas em PI⁵⁵ . Esta citocina foi identificada em diversos estudos, em fluído crevicular e saliva total, sendo que em todos, de forma mais ou menos evidente, esta se encontrava sobre-regulada (135.3, 95.48, 6.52, 46.88 e 7.71). Curtis *et al*¹¹⁵ demonstraram que a quantificação da IL-1 β pode ser um importante complemento aos dados clínicos no estabelecimento do diagnóstico de PI¹⁸ . Também a citocina inflamatória **Tumor necrosis factor (TNF- α)** induz vários eventos associados à inflamação, destruição tecidual, reabsorção óssea e produção de MMP e PGE2¹⁸ , tendo-se apresentado sobre-regulada em todos os artigos analisados (163, 4.83, 4, 3.67). Os dados na literatura sugerem uma correlação linear entre os níveis de TNF e o grau de inflamação em torno dos implantes¹⁸ . Similarmente, outras interleucinas pró-inflamatórias revelaram-se aumentadas em PI. São exemplos disso a **Interleukin-12** (7.35), **Interleukin-8** (7.6; 34.9; 5 e 42.43) e **Interleukin-6** (11.1; 6.45 e 67.3).
- **Citocinas Anti-inflamatórias:** um estudo mostrou que os níveis de **Interleukin-10** (IL-10), uma citocina anti-inflamatória, se reduz com a transição do estado saudável para mucosite e desta para PI (-5.88)¹¹⁰ . De acordo com Casado *et al*⁶⁰ , os níveis de IL-10 tendem a reduzir com a progressão da PI e aprofundamento das bolsas (-2.17). Por outro lado, outros relatos não mostraram diferenças nos níveis de IL-10 entre os grupos (1.23)¹¹⁰ , ou mesmo reportam níveis mais elevados de IL-10 na peri-implantite em comparação com locais com mucosite (3.5)¹⁰⁹ . De forma análoga, também a interleucina anti-inflamatória (**IL-4**) se encontrou sub-regulada (-2.44).
- **Metaloproteinases (MMPs):** um vasto número de publicações tem demonstrado que a atividade e a expressão de metaloproteinases de matriz estão significativamente aumentadas no tecido gengival afetado pela PI. No estudo realizado por Kivelä-Rajamäki M. *et al*⁹² , o autor relatou uma sobre-regulação das MMP7 e MMP8 de 11.3 e 9.7, respetivamente e Özçakır-Tomruk C. *et al*⁹⁶ documentou uma sobre-regulação de 10.34 para a PI. Estes valores elevados de

MMP apresentaram um decréscimo para níveis próximos dos detetados em locais saudáveis, em pacientes após tratamento periodontal. Com base nestes dados bioquímicos e imunológicos, os fluidos orais têm sido alvo de uma extensa investigação sobre a utilização de metaloproteinases de matriz e seus reguladores como potenciais candidatos em testes para monitorização de doenças periodontais e peri-implantares⁶⁴.

- **Tríade RANK/RANKL/OPG:** a interação RANK/RANKL mostrou ser necessária para a ativação dos osteoclastos, sendo a OPG responsável pela inibição desta interação. De acordo com o levantamento de dados realizado, o RANK apresentou-se sobre-regulado em PI (2.73 e 2.98), assim como o RANKL (23.5 e 1.79). De forma inversa, a OPG revelou-se diminuída em alguns estudos (-3.22, -2.14 e -1.47), tendo ainda evidenciado uma sobre-regulação de 40.08 num dos estudos analisados. À luz destes dados, podemos facilmente depreender que um aumento dos valores de RANK e RANKL, e uma diminuição de OPG, se traduza num aumento da produção de osteoclastos, conduzindo desta forma à reabsorção de tecido ósseo, processo patológico verificado na PI. Posto isto, uma diminuição dos valores de OPG (sub-regulação) pode ser indicativo de doença, tal como verificado em diversos estudos analisados^{102,105,106}.
- **Cathepsin K:** esta como já referido, é a única cisteína-protease lisossómica com capacidade para degradar a matriz óssea incluindo colagénio tipo 1, osteopontina e osteonectina sob pH ácido. Assim sendo, a sobre-regulação desta enzima, verificada em diversos estudos (2.21, 2.98, 2.32 e 4.48)^{6,98-100} é considerada um marcador altamente específico de reabsorção óssea ativa e atividade osteoclástica⁶.
- **Sclerostin:** esta proteína foi identificada no estudo de Rakic M. *et al* (2014)⁶ com a sua regulação aumentada (17.97). A *sclerostin* é produzida por citocinas pró-inflamatórias e regula negativamente a formação óssea contudo, a sua produção foi também relacionada com a aplicação de carga excessiva, pelo que pode ser utilizado como um indicador de PI, não só pela presença de inflamação crónica, mas também devido à presença de forças biomecânicas inadequadas⁶.
- **Interleukin-10 (IL-10):** Um estudo mostrou que os níveis de IL-10, uma citocina

anti-inflamatória, se reduz com a transição do estado saudável para mucosite e desta para PI (-5.88)¹¹⁰. De acordo com Casado *et al*⁶⁰, os níveis de IL-10 tendem a reduzir com a progressão da PI e aprofundamento das bolsas (-2.17). Por outro lado, outros relatos não mostraram diferenças nos níveis de IL-10 entre os grupos (1.23),¹¹⁰ ou mesmo reportam níveis mais elevados de IL-10 na PI em comparação com locais com mucosite (3.5)¹⁰⁹.

Foi verificada ainda a sobre-regulação de outras proteínas, como é o caso da *Alpha 2-macroglobulin* (8.1), *Interleukin-12* (7.35), *Macrophage inflammatory protein 1-alpha* (18.35), *Tenascin-C* (5), *High mobility group protein B1* (46.26), *vascular endothelial growth factor A* (2.18), MCP-1 (3.93), CCR-2 (3.08), CCR-4 (3.4), CCR-5 (3.38), CXCR-3 (3.47), *Collagen alpha-1(V) chain* (3.64), *Collagenase 3* (14), *B-lymphocyte antigen CD20* (7.31) e *T-cell surface glycoprotein CD3 gamma chain* (12.36) e a sub-regulação do *Plasminogen activator inhibitor 2* (-4.76). Assim sendo, são necessários mais estudos no sentido de esclarecer o papel destas moléculas no mecanismo fisiopatológico da PI.

3.1.4 Caracterização dos indivíduos da amostra

Foram anotados dados relativamente à faixa etária, género e hábitos sociais, por forma a caracterizar os indivíduos incluídos na amostra de estudo. É importante ter em conta estas informações na interpretação de resultados de proteómica, pois podem contribuir para a sub ou sobre-expressão de proteínas.

No que concerne à análise da faixa etária obteve-se um intervalo compreendido entre os 18 e os 93 anos de idade. É necessário ter em conta os efeitos do envelhecimento, pois durante este ocorre uma acumulação de alterações genómicas, que interferem na realização dos processos biológicos, no metabolismo, e todas estas alterações se vão refletir na composição salivar e do fluído crevicular, pelo que é possível que haja alterações na expressão de algumas proteínas. Adicionalmente, com a idade as pessoas vão acumulando mediadores da inflamação, que é um processo chave no desenvolvimento da PI. Deste modo, o aumento das moléculas inflamatórias pode não estar relacionado com o desenvolvimento da PI, mas sim com fatores relacionados com o envelhecimento.

Relativamente à análise dos géneros, temos que todos os estudos analisados incluíram na sua amostra indivíduos de ambos os géneros, sendo que uns não verificaram diferenças entre os grupos e outros não chegaram sequer a fazer essa comparação¹¹⁶ .

No âmbito dos estudos analisados, o tabagismo foi o único hábito social analisado, sendo que todos os outros constituíram fatores de exclusão. O tabagismo tem sido associado a uma maior expressão do recetor de produtos finais da glicosilação avançada nos tecidos peri-implantares^{117,118} . Os resultados experimentais de Katz *et al*¹¹⁷ demonstram uma expressão aumentada destes recetores nas células epiteliais gengivais de fumadores, em comparação com não-fumadores, que se pensa que seja causado pela nornicotina, um metabolito da nicotina. Isto estimula a secreção de citocinas e espécies reativas de oxigénio, que conduzem a um aumento da perda óssea alveolar¹¹⁷ . Além disso, existe um efeito sinérgico entre o tabagismo e o polimorfismo do gene da Interleucina-1, que resulta num maior risco de PI¹¹⁹ . Posto isto, a existência de um hábito social como o tabagismo é passível de alterar a expressão de determinadas proteínas¹²⁰ .

3.1.5 Métodos de recolha e análise da amostra

Em todos os artigos analisados foram realizados estudos de não-proteómica ou seja, estudos dirigidos, pois até agora, que seja do nosso conhecimento, ainda não existem estudos de proteómica em PI. Estes estudos dirigidos, por norma, procuram identificar um número reduzido de proteínas, cuja evidência da sua possível implicação na doença já tenha sido relatada. A anotação dos métodos quer de recolha quer de análise das amostras é também relevante, pois a diversidade de técnicas utilizadas pode influenciar a quantificação de proteínas, limitando a comparação entre estudos.

3.2 Caracterização funcional

3.2.1 Caracterização funcional das proteínas humanas envolvidas em peri-implantite

Com o intuito de realizar a caracterização funcional das proteínas envolvidas em PI, previamente anotadas manualmente na base de dados SalivaTecDB, recorreu-se à ferramenta bioinformática PANTHER. No sentido de esclarecer o papel e a importância funcional destas, as mesmas foram agrupadas nas ontologias *Molecular Function*, *Biological Process* e *Pathway*, tendo sido gerados resultados para as proteínas com origem em fluido crevicular e saliva total, consideradas as proveniências mais relevantes para este trabalho.

Funções Moleculares

A análise para a ontologia *Molecular Function*, revelou que nesta participam 46 proteínas com origem no fluido crevicular e 15 com origem na saliva total.

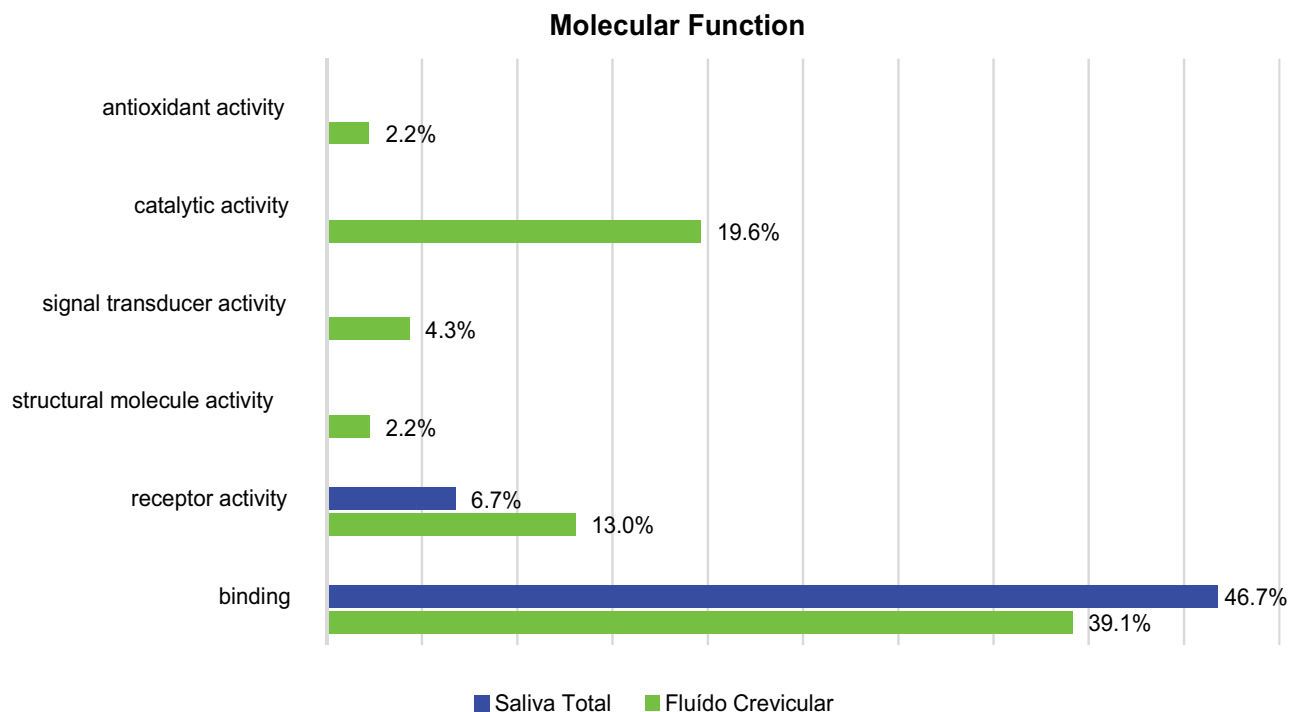


Figura 3.3: Gráfico representativo da distribuição de proteínas com origem no fluido crevicular, obtido pelo PANTHER, para a ontologia 'Molecular Function'.

Como é possível verificar no Gráfico 3.3, as funções moleculares que apresentam

mais proteínas envolvidas com origem no fluído crevicular correspondem a *binding* e *catalytic activity*, com 18 e 9 proteínas, respetivamente. Por outra, aquelas recolhidas na saliva total representam apenas dois processos, sendo eles *binding* e *receptor activity*, com 7 e 1 proteínas, respetivamente.

Processos Biológicos

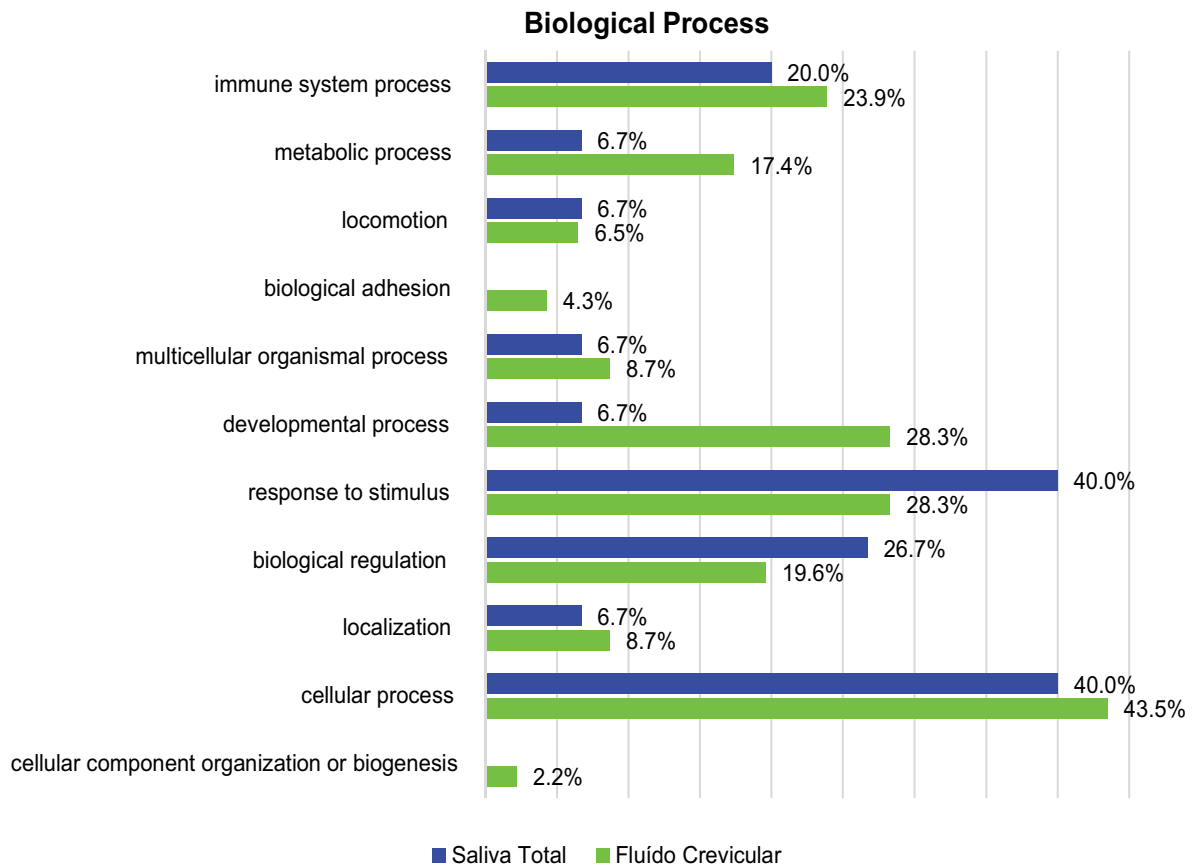


Figura 3.4: Gráfico representativo da distribuição de proteínas com origem no fluído crevicular, obtido pelo PANTHER, para a ontologia 'Biological Process'.

Por forma a catalogar as proteínas com origem no fluído crevicular, de acordo com a ontologia *Biological Process* recorreu-se igualmente à ferramenta PANTHER. Da mesma forma, nesta participam 46 proteínas com origem no fluído crevicular e 15 com origem na saliva total. Tal como se pode verificar no Gráfico 3.4, para as proteínas com origem no fluído crevicular, *celular process* é o processo biológico que apresenta um maior número de proteínas envolvidas, nomeadamente 20, o que se prende provavelmente com o facto de esta ontologia ser bastante abrangente e redundante. A seguir a esta, encontram-se os processos *response to stimulus* e *developmental pro-*

cess, ambos com 13 proteínas e *immune system process* com 11. Este último mereceu particular atenção devido à sua potencial relação com PI, pelo que se avaliou a sua sub-divisão. Posto isto, concluímos que as 11 proteínas envolvidas na ontologia *immune system process* pertencem, na sua sub-divisão, a *immune response*, como se atenta no Gráfico 3.5.

Por forma a sermos ainda mais específicos, criámos uma nova sub-divisão, na qual se apresentaram as funções *complement activation* e *response to interferon-gamma*, as quais compreendem um total de 9 proteínas envolvidas, correspondendo a 33.3% e 66.7%, respetivamente, tal como se pode observar no Gráfico 3.6.

Biological Process - Immune System Process

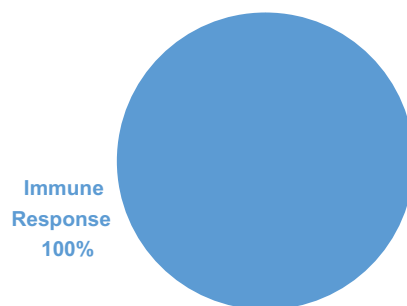


Figura 3.5: Gráfico representativo da distribuição de proteínas com origem no fluído crevicular, obtido pelo PANTHER, anotadas no nível 1 da ontologia 'Biological Process' na função Immune System Process.

Biological Process - Immune System Process - Immune Response

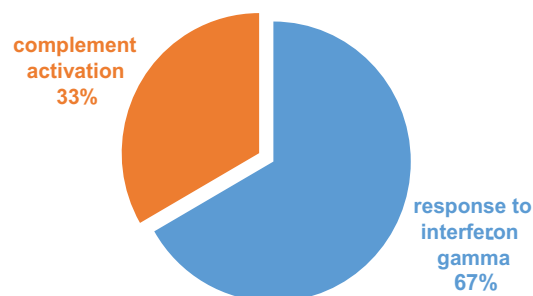


Figura 3.6: Gráfico representativo da distribuição de proteínas com origem no fluído crevicular, obtido pelo PANTHER, anotadas no nível 2 da ontologia 'Biological Process' na função Immune Response.

Tendo em conta que o processo *response to stimulus* é bastante abrangente e

genérico, foi realizada igualmente a sua sub-divisão para melhor entendimento da sua relação com PI (ver Gráfico 3.7) .

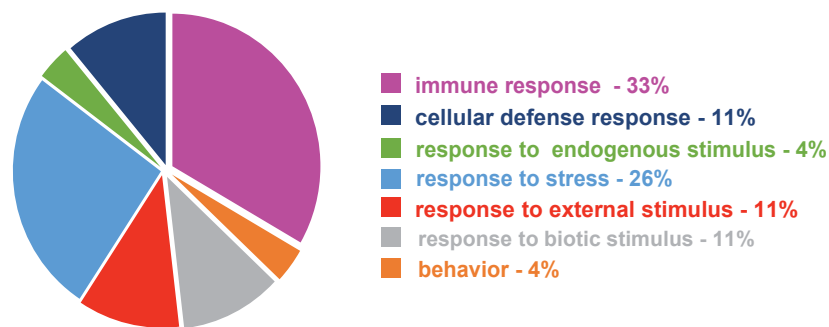


Figura 3.7: Gráfico representativo da distribuição de proteínas com origem no fluido crevicular, obtido pelo PANTHER, anotadas no nível 1 da ontologia 'Biological Process' na função Response to stimulus.

Da análise do Gráfico 3.6, observa-se que a maior parte das proteínas presentes em *response to stimulus* estão também envolvidas em *immune response*. Desta forma, estão representados os mesmos mecanismos de *immune system process*. Para além disso, estão igualmente presentes moléculas relacionadas com *response to stress*. A relação do stress oxidativo com a doença periodontal é já bem conhecida, tendo já vários estudos demonstrado seu papel na patogénese desta¹²¹ . A deteção de espécies reativas de oxigénio e produtos de oxidação no fluido crevicular, bem como o desequilíbrio da atividade oxidante/antioxidante nas bolsas periodontais sugerem o papel determinante das primeiras no processo de destruição de tecido periodontal. Liskmann S. *et al*¹⁰⁹ verificaram inclusive que o status antioxidante total da saliva, bem como a concentração de ácido úrico e ascorbato, que são os principais antioxidantes salivares, estão significativamente reduzidos em pacientes com doença peri-implantar. Embora o papel do stress oxidativo tenha sido já amplamente estudado em periodontite, existe uma lacuna de informações no que concerne ao papel deste na doença peri-implantar, sendo necessários mais estudos neste sentido¹²² .

Por outro lado, relativamente às proteínas com origem na saliva total, como se atenta no Gráfico 3.6, os processos biológicos que apresentam um maior número de proteínas envolvidas são *response to stimulus* e *cellular process*, ambos com um total de 6 proteínas envolvidas, seguidos de *biological regulation*, com 4 proteínas envolvidas. Em termos comparativos, podemos dizer que, com base nos resultados obtidos, na saliva estão mais representados os processos *response to stimulus* e *biological regulation*,

enquanto no fluído crevicular estão mais representados *metabolic process* e *development process*.

Vias de Sinalização

Por fim, foi realizada a caracterização funcional para a ontologia *pathways*, mais uma vez com recurso à ferramenta PANTHER, para as proteínas envolvidas em PI e recolhidas quer em fluído crevicular quer em saliva total, na qual participam 46 e 15 proteínas, respetivamente. Os resultados são apresentados no Gráfico 3.8.

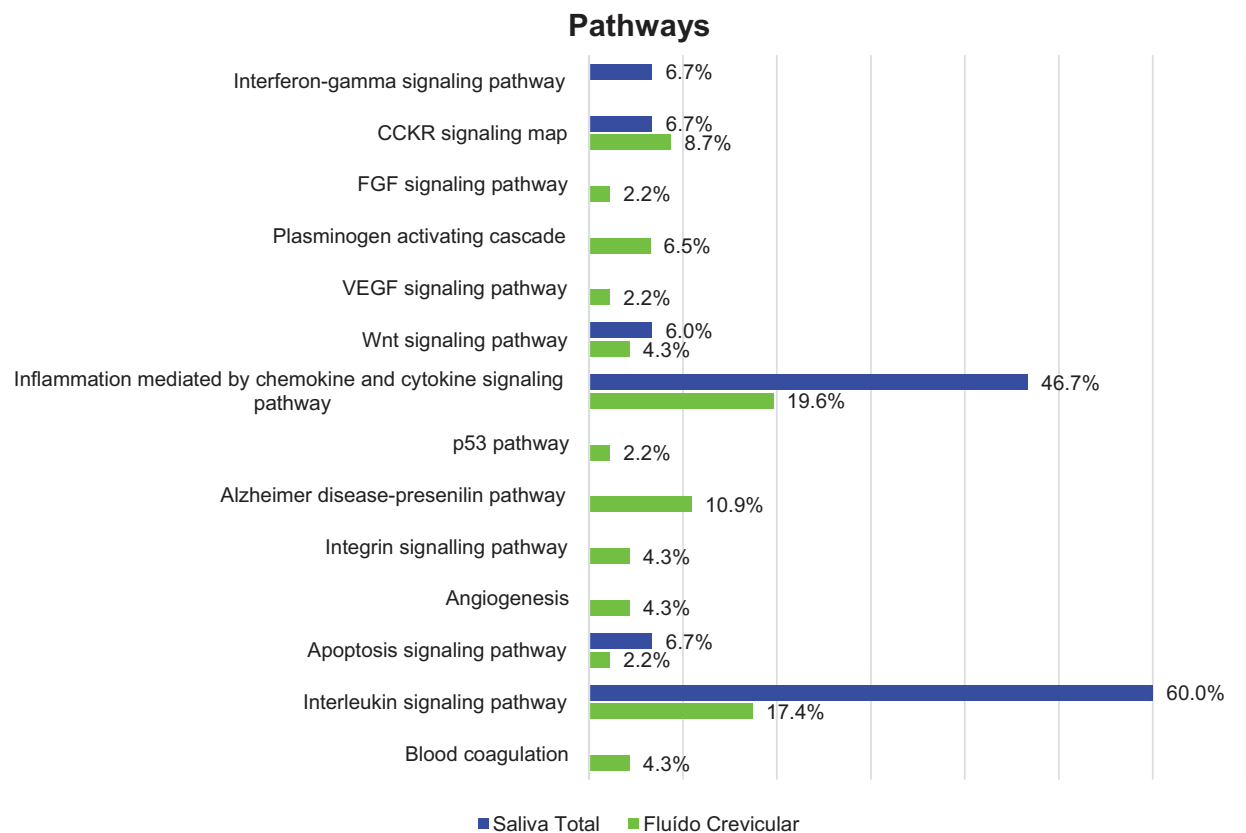


Figura 3.8: Gráfico representativo da distribuição de proteínas com origem no fluído crevicular, obtido pelo PANTHER, para a ontologia 'Pathways'.

Devido ao elevado número de *pathways* apresentadas, foram incluídos apenas neste trabalho aqueles que eram comuns para a PI. As vias de sinalização que apresentaram um maior número de proteínas envolvidas para o fluído crevicular são *Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway*, *Interleukin signaling pathway* e *Alzheimer disease-presenilin pathway*, com 9, 8 e 5 proteínas, respetivamente. No que concerne à saliva total, temos que existe um maior número de proteínas envolvidas nas vias de sinalização *Interleukin signaling pathway* e *Inflam-*

mation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway, com 9 e 7 proteínas, respetivamente. Nas restantes encontra-se envolvida apenas uma proteína.

Desta análise, podemos constatar uma vez mais a grande importância da resposta imune no desenvolvimento da PI uma vez a grande maioria dos *pathways* identificados representa esta resposta. Podemos ainda ver que a saliva é um bom fluido para identificar alterações em mecanismos moleculares da PI que envolvam quimiocinas e interleucinas uma vez que este fluido apresenta elevada percentagem de proteínas envolvidas nos *pathways* (*Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway* e *Interleukin signaling pathway*).

3.3 Comparação com o OralOma normal

A comparação das proteínas identificadas em PI com as proteínas identificadas em pessoas saudáveis (OralOma normal) permite avaliar quais os mecanismos moleculares mais alterados em PI.

3.3.1 Funções moleculares das proteínas envolvidas em peri-implantite

No Gráfico 3.9 é apresentada a diferença fraccional entre as proteínas identificadas em PI e no OralOma normal, para a ontologia *Molecular Function*. No fluido crevicular, a única função molecular que apresenta diferença estatisticamente significativa ($p = 0.006$) entre doença e indivíduos saudáveis é **receptor activity**. Por outro lado, para as proteínas com origem na saliva total, nenhuma das funções moleculares obtidas, nomeadamente **binding** e **receptor activity**, apresentaram uma diferença estatisticamente significativa entre a doença e o estado saudável.

Receptor activity

A função molecular *receptor activity* é definida como a combinação com um mensageiro extra ou intra-celular, para iniciar uma mudança na atividade da célula. Neste grupo encontram-se as seguintes proteínas: *Tumor factor necrosis* ($TNF-\alpha$), *CD40 ligand*, *Laminin subunit gamma 2*, *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B* (Osteoprotegerin), *Tumor Necrosis factor ligand superfamily member 11* (RANKL)

e *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A* (RANK). É possível verificar que este conjunto possui elementos envolvidos na resposta inflamatória e em processos de remodelação óssea, anteriormente descritos e relacionados com PI.

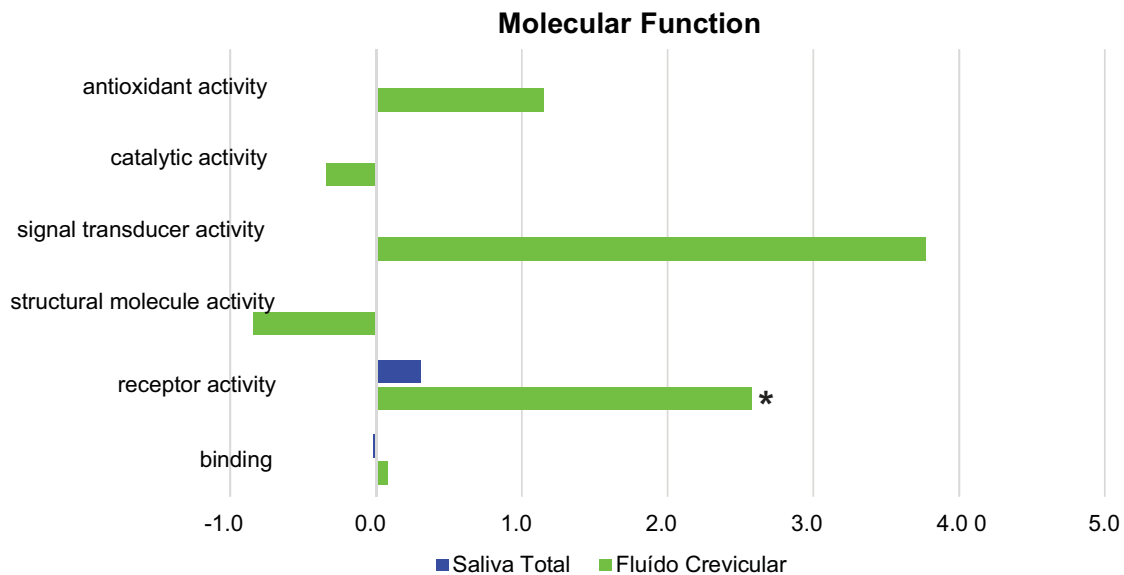


Figura 3.9: Distribuição das proteínas com origem em fluido crevicular e saliva total de pacientes com PI, segundo as funções moleculares em que intervém, através da ferramenta PANTHER. A função molecular que apresenta alteração estatisticamente significativa em relação ao OralOma normal encontram-se assinaladas com asterisco.

3.3.2 Procesos biológicos das proteínas envolvidas em peri-implantite

No Gráfico 3.10 é apresentada a diferença fracional entre as proteínas identificadas em PI e no OralOma normal. Para o fluido crevicular, o número de proteínas envolvidas nos processos biológicos **response to stimulus** ($p = 0.00035$), **developmental process** ($p = 8.36 \times 10^{-5}$), **locomotion** ($p = 0.004$) e **immune system process** ($p = 0.002$), encontram-se significativamente aumentados em PI, quando comparados com o OralOma normal. Já para a saliva total, o único processo biológico que apresenta significância estatística é **response to stimulus** ($p = 0.0039$). Todos estes se encontram assinalados com um asterisco no Gráfico 3.10.

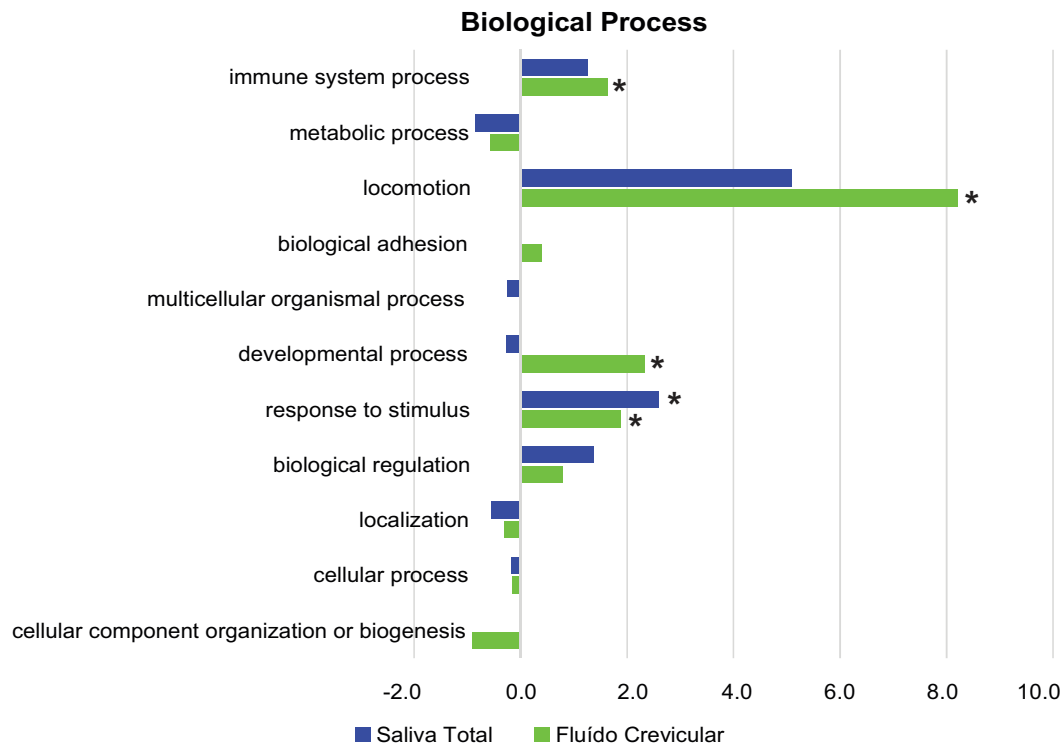


Figura 3.10: Distribuição das proteínas com origem em fluido crevicular e saliva total de pacientes com PI, segundo os processos biológicos em que intervém, através da ferramenta PANTHER. Os processos biológicos que apresentam alterações estatisticamente significativas em relação ao OralOma normal estão assinaladas com asterisco.

Response to stimulus

No que concerne ao processo biológico *response to stimulus*, este é definido como qualquer processo que resulte numa mudança de estado ou atividade de uma célula ou de um organismo (em termos de movimento, secreção, produção de enzimas, expressão génica, etc.) como resultado de um estímulo. O processo começa com a deteção do estímulo e termina com uma mudança de estado ou atividade ou a célula ou organismo.

Neste estão presentes as seguintes proteínas: *Tumor factor necrosis* (TNF- α), *CD40 ligand*, *Eotaxin*, *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B* (Osteoprotegerin), *Tumor Necrosis factor ligand superfamily member 11* (RANKL) e *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A* (RANK), *Interleukin-1 Beta* (IL-1 β), *Interleukin-1 receptor antagonist protein* (IL1RN), *Macrophage inflammatory protein 1-alpha* (CCL3 ou MIP1A), *Interleukin-8* (CXCL8), *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (CSF2), *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) e *Metallo-*

proteinase inhibitor 2 (TIMP2). Já para a saliva total, as proteínas integrantes neste processo são: TNF- α , *Interleukin-1 alpha* (IL1A), *Interleukin-1 receptor antagonist protein* (IL1RN), *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (CSF2), *Interleukin-1 Beta* (IL-1 β) e *Interleukin-8* (CXCL8). Ao analisar estes dados verificamos que neste leque de proteínas existem algumas citocinas e quimiocinas responsáveis por desencadear e perpetuar o processo inflamatório, proteínas ligadas à remodelação óssea (RANK/RANKL/OPG) e também à angiogénese - processo necessário na inflamação crónica - como é o caso do VEGF-A. Por outro lado, verificamos também a presença de antagonistas destes processos, como é o caso da IL1RN e do TIMP2, que podemos interpretar como a resposta do hospedeiro na tentativa de combater a doença instalada.

Developmental process

Developmental process consiste num processo biológico cujo resultado específico é a progressão de uma unidade de vida integrada: uma estrutura anatómica (que pode ser uma estrutura sub-celular, célula, tecido ou órgão) ou organismo ao longo do tempo, desde uma condição inicial até uma condição posterior.

Neste intervêm as seguintes proteínas: TNF- α , *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (CSF2), *Alkaline phosphatase* (ALPL), *Osteocalcin*, *Fibroblast growth factor 2* (FGF2), *CD40 ligand*, RANK, RANKL, *Osteoprotegerin*, *tenascin*, VEGF-A e *Laminin subunit gamma 2*. Mais uma vez, verificamos uma forte presença das moléculas RANK, RANKL e OPG, intervenientes do metabolismo ósseo. Tal como previamente referido na Secção 3.1.3, temos que a interação RANK/RANKL é necessária para ativação dos osteoclastos, sendo que a OPG é responsável pela inibição desta. O equilíbrio entre estas proteínas traduz-se na manutenção dos níveis de osso alveolar, sendo que a desmineralização e reabsorção por parte dos osteoclastos e deposição de novo osso por parte dos osteoblastos se efetua de forma equivalente, mantendo assim a massa óssea apropriada para o stress exercido sobre esta. Acontece que, de acordo com o levantamento de dados realizado, o RANK e RANKL revelaram-se aumentados em PI, sendo que de forma inversa, a OPG se encontrava diminuída em alguns estudos^{102,105,106}. Assim sendo, a produção de osteoclastos efetuar-se-á em níveis superiores ao normal, pelo que o ciclo de remodelação óssea se irá realizar no

sentido da sua reabsorção, o que é consistente com o processo patológico existente na PI.

Locomotion

O processo biológico *locomotion* é definido como qualquer processo que ative ou aumente a frequência, a taxa ou a extensão de uma célula ou organismo. Posto isto, é lógico perceber as proteínas que neste integram, como se segue: *Interleukin-8*, *Macrophage inflammatory protein 1-alpha* e *eotaxin*. A *Interleukin-8* é uma quimiocina que está associada ao estágio inicial da PI, pois desempenha um papel fundamental no início do processo inflamatório, através do recrutamento seletivo e ativação de neutrófilos e do seu encaminhamento para o sulco gengival. O mesmo acontece com a MIP1A, que estimula a migração seletiva de monócitos e linfócitos para locais de inflamação. Por seu lado, a eotaxin atua através do recetor de quimiocinas CC3, e possui um papel quimiotático para diferentes células imunes, como é o caso de eosinófiols, basófilos, células mieloides e linfócitos Th-2¹²³. Apesar de ainda não ter sido estabelecido o seu papel em PI, foram encontrados níveis séricos superiores desta proteína em pacientes com periodontite¹²³, pelo que poderá ser um alvo interessante a explorar em estudos futuros.

Immune system process

Immune system process diz respeito a qualquer processo envolvido no desenvolvimento ou funcionamento do sistema imunológico, constituindo um sistema do próprio organismo com vista a dar respostas calibradas a potenciais ameaças internas ou invasivas. Assim sendo, neste intervêm as seguintes proteínas: *TNF- α* , *CD40 ligand*, *Eotaxin*, *CCL3*, *Osteoprotegerin*, *RANKL*, *RANK*, *Interleukin-8*, *Myeloperoxidase* (MPO), *Cysteine and glycine-rich protein 2* (CSRP2) e *Alpha 2-Macroglobulin* (A2M). Como se pode verificar pela análise do Gráfico 3.10, este leque de proteínas representa a resposta imunológica do organismo, bem como a reação de defesa do mesmo em resposta à agressão bacteriana.

3.3.3 Vias de sinalização das proteínas envolvidas em peri-implantite, com origem no fluído crevicular

No Gráfico 3.11 é apresentada a diferença fracional entre as proteínas identificadas em PI e no OralOma normal. No que concerne ao fluído crevicular, o número de proteínas envolvidas nas vias de sinalização *Interleukin signaling pathway* ($p = 9.7 \times 10^{-9}$), *Angiogenesis* ($p = 0.005$), *Alzheimer disease-presenilin pathway* ($p = 0.00066$), *Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway* ($p = 6.8 \times 10^{-5}$), *Plasminogen activating cascade* ($p = 0.0085$) e *CCKR signaling map* ($p = 0.005$), destacados no Gráfico 3.11 com um asterisco, encontram-se significativamente aumentados em PI, comparativamente com o OralOma normal. Por outro lado, respeitante aos resultados para a saliva total, temos que o número de proteínas envolvidas nas vias de sinalização *Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway* ($p = 1.04 \times 10^{-6}$), *Interleukin signaling pathway* ($p = 3.75 \times 10^{-14}$) e *Interferon-gamma signaling pathway* ($p = 0.03$), também assinalados com asterisco no Gráfico 3.11, se encontram significativamente aumentados em PI, comparativamente com o OralOma normal.

Tendo em consideração o conjunto de vias de sinalização alteradas de forma estatisticamente significativa, podemos destacar algumas com relação já estabelecida com o processo de PI, como é o caso de *Interferon-gamma signaling pathway*, *Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway*, *Interleukin signaling pathway* e *Angiogenesis*, tal como descrito previamente nas Secções 3.3.2-3.3.2.

No que concerne a *Plasminogen activating cascade*, temos que a regulação da ativação do plasminogénino já se encontra descrito na literatura como um elemento chave no controlo de eventos proteolíticos da matriz extracelular. Inclusivamente, a proteína *plasminogen activator inhibitor 2*, presente nesta *pathway*, foi sugerida como biomarcador para avaliar a severidade das doenças periodontais. Dito isto, constitui um alvo promissor de estudos futuros no âmbito da PI¹²⁴.

Por outro lado, as vias de sinalização *Alzheimer disease-presenilin pathway* e *CCKR signaling map*, que à partida não estariam aparentemente relacionadas com a patologia em estudo, apresentam como proteínas intervenientes metaloproteínas e quimiocinas, cujo papel em PI já foi previamente descrito. Contudo, devido à

carência de suporte bibliográfico que implique estas *pathways* na fisiopatologia da PI, são sugeridos mais estudos no sentido do seu esclarecimento.

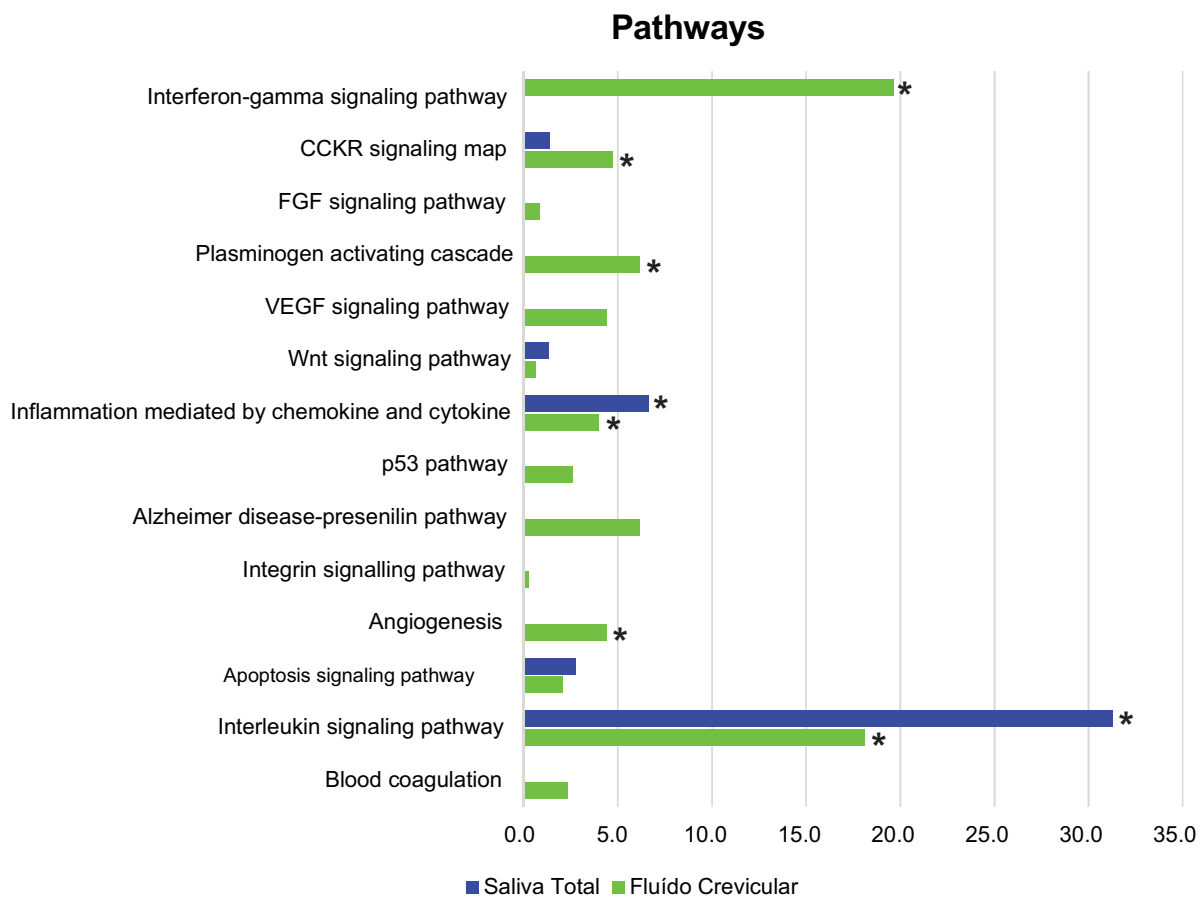


Figura 3.11: Distribuição das proteínas com origem em fluido crevicular e saliva total de pacientes com PI, segundo as vias de sinalização em que intervém, através da ferramenta PANTHER. As vias de sinalização que apresentam alterações estatisticamente significativas estão assinaladas com asterisco.

Por fim, da análise do Gráfico 3.11 podemos ainda constatar que a saliva parece ter maior poder para encontrar diferenças nas vias de sinalização *Interferon-gamma signaling pathway* e *Interleukin signaling pathway*, uma vez que a diferença destas para o OralOma normal é muito mais notória do que no fluido crevicular.

Capítulo 4

Conclusões

Este trabalho de investigação teve como objetivo inicial a atualização do OralOma da peri-implantite, sendo que para isso foi realizada uma análise de resultados de estudos dirigidos, com amostras obtidas da cavidade oral de indivíduos com esta patologia, sendo realizada subsequentemente a anotação manual de informações consideradas relevantes para a interpretação dos dados catalogados. Assim sendo, foram acrescentadas 58 proteínas às 36 já existentes, perfazendo um total de 96 proteínas, o que se traduz num passo em frente para o entendimento desta patologia. O facto de os estudos realizados utilizarem metodologias e técnicas de quantificação distintas, limita a interpretação de dados e a validação de determinadas proteínas como biomarcadores. Contudo, permite-nos ainda assim conhecer a tendência de sobre ou sub-regulação de cada proteína no estado patológico, o que nos possibilita aferir acerca dos processos patológicos desencadeados.

A caracterização funcional do OralOma da PI, quando comparado com o OralOma normal, permitiu inferir um aumento da interferência de determinadas proteínas, que poderão ser utilizadas para auxiliar no diagnóstico precoce da PI. A principal característica que torna uma proteína um biomarcador fidedigno é a sua especificidade, ou seja, ser exclusiva em PI ou encontrar-se em grande quantidade no estado de doença, quando comparado com o estado de saúde. Portanto, mais do que a sua presença em doença, aqui importa principalmente a sua regulação, dado que todas as proteínas também foram encontradas no estado saudável. Assim sendo, a sobre-regulação da IL1 β e MPO e a sub-regulação da IL10 foram apontados como biomarcadores inflamatórios, do estado inicial da patogénese da PI, dado que os dois primeiros desencadeiam e potenciam a resposta inflamatória e o terceiro a antagoniza. A MMP-8 parece ser útil para monitorizar a fase de destruição do tecido conjuntivo da peri-implante,

porém este achado requer validação. Por fim, temos que a sobre-regulação do RANK, RANKL e TNF- α , bem como a sub-regulação da OPG, são promissores biomarcadores de remodelação óssea, podendo estar associados à perda óssea em torno dos implantes.

Todavia, estudos adicionais envolvendo um maior número de indivíduos são necessários para validação dos biomarcadores de PI. Além disso, a colheita de fluido crevicular peri-implantar, bem como a sua análise e quantificação, devem ser padronizadas para que estudos futuros possam gerar dados comparáveis, a fim de determinar o intervalo de valores que caracteriza o estado saudável para cada proteína, com vista a tornar mais simples, célere e eficiente o diagnóstico e tratamento da PI. A comparação dos dados obtidos em fluido crevicular e em saliva permitirão no futuro a utilização da saliva total no diagnóstico das doenças peri-implantares, de modo a tornar este processo cada vez menos invasivo. Espera-se que os dados gerados neste trabalho possam contribuir para a identificação de moléculas e mecanismos moleculares que possibilitem o diagnóstico precoce, a determinação da suscetibilidade do doente e a determinação do prognóstico dos implantes afetados. Este conhecimento poderá ajudar a orientar abordagens de tratamento personalizadas para cada indivíduo e avaliar o sucesso da terapêutica.

Referências

- [1] Carl E Misch. *Dental Implants Prosthetics*. 2nd ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2015.
- [2] Franck Renouard, Rangert B. *Risk factors in Implant Dentistry*. Paris, France: Quintessence Books; 1999.
- [3] R Hupp J, Ellis III E, R Tucker M. *Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea*. Tradução da 5ª edição ed. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier; 2009.
- [4] Zani SR, Moss K, Shibli JA, Teixeira ER, de Oliveira Mairink R, Onuma T, et al. Peri-implant crevicular fluid biomarkers as discriminants of peri-implant health and disease. *Journal of Clinical Periodontology*. 2016 Oct;43(10):825–832.
- [5] Moon IS, Berglundh T, Abrahamsson I, Linder E, Lindhe J. The barrier between the keratinized mucosa and the dental implant. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*. 1999 Oct;26(10):658–663.
- [6] Rakic M, Struillou X, Petkovic-Curcin A, Matic S, Canullo L, Sanz M, et al. Estimation of bone loss biomarkers as a diagnostic tool for peri-implantitis. *Journal of Periodontology*. 2014 Nov;85(11):1566–1574.
- [7] Berglundh T, Zitzmann NU, Donati M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *Journal of Clinical Periodontology*. 2011 Mar;38 Suppl 11:188–202.
- [8] Carcuac O, Berglundh T. Composition of human peri-implantitis and periodontitis lesions. *Journal of Dental Research*. 2014 Nov;93(11):1083–1088.
- [9] Carcuac O, Abrahamsson I, Albouy JP, Linder E, Larsson L, Berglundh T. Experimental periodontitis and peri-implantitis in dogs. *Clinical Oral Implants Research*. 2013 Apr;24(4):363–371.

- [10] Malik N, Naik D, Uppoor A. Levels of Myeloperoxidase and Alkaline Phosphatase in Periimplant Sulcus Fluid in Health and Disease and After Nonsurgical Therapy. *Implant Dentistry*. 2015 Aug;24(4):434–440.
- [11] Oh TJ, Yoon J, Misch CE, Wang HL. The causes of early implant bone loss: myth or science? *Journal of Periodontology*. 2002 Mar;73(3):322–333.
- [12] Algraft H, Borumandi F, Cascarini L. Peri-implantitis. *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*. 2012 Dec;50(8):689–694.
- [13] Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. The efficacy of interventions to treat peri-implantitis: a Cochrane systematic review of randomised controlled clinical trials. *European Journal of Oral Implantology*. 2008;9 Suppl 1(2):111–125.
- [14] Derks J, Schaller D, Håkansson J, Wennström JL, Tomasi C, Berglundh T. Effectiveness of Implant Therapy Analyzed in a Swedish Population: Prevalence of Peri-implantitis. *Journal of Dental Research*. 2016 Jan;95(1):43–49.
- [15] Mir-Mari J, Mir-Orfila P, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C. Prevalence of peri-implant diseases. A cross-sectional study based on a private practice environment. *Journal of Clinical Periodontology*. 2012 May;39(5):490–494.
- [16] Lindhe J, Meyle J, Group D of European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008 Sep;35(8 Suppl):282–285.
- [17] Lang NP, Berglundh T, Working Group 4 of Seventh European Workshop on Periodontology. Periimplant diseases: where are we now?—Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*. 2011 Mar;38 Suppl 11:178–181.
- [18] Petković AB, Matić SM, Stamatović NV, Vojvodić DV, Todorović TM, Lazić ZR, et al. Proinflammatory cytokines (IL-1beta and TNF-alpha) and chemokines (IL-8 and MIP-1alpha) as markers of peri-implant tissue condition. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2010 May;39(5):478–485.

- [19] Costa FO, Takenaka-Martinez S, Cota LOM, Ferreira SD, Silva GLM, Costa JE. Peri-implant disease in subjects with and without preventive maintenance: a 5-year follow-up. *Journal of Clinical Periodontology*. 2012 Feb;39(2):173–181.
- [20] Derks J, Tomasi C. Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *Journal of Clinical Periodontology*. 2015 Apr;42 Suppl 16:S158–171.
- [21] Esposito M, Hirsch J, Lekholm U, Thomsen P. Differential diagnosis and treatment strategies for biologic complications and failing oral implants: a review of the literature. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 1999 Aug;14(4):473–490.
- [22] Roos-Jansåker AM, Lindahl C, Renvert H, Renvert S. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part I: implant loss and associations to various factors. *Journal of Clinical Periodontology*. 2006 Apr;33(4):283–289.
- [23] Brägger U. Use of radiographs in evaluating success, stability and failure in implant dentistry. *Periodontology 2000*. 1998 Jun;17:77–88.
- [24] Duarte PM, Serrão CR, Miranda TS, Zanatta LCS, Bastos MF, Faveri M, et al. Could cytokine levels in the peri-implant crevicular fluid be used to distinguish between healthy implants and implants with peri-implantitis? A systematic review. *Journal of Periodontal Research*. 2016 Dec;51(6):689–698.
- [25] Faot F, Nascimento GG, Bielemann AM, Campão TD, Leite FRM, Quirynen M. Can peri-implant crevicular fluid assist in the diagnosis of peri-implantitis? A systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology*. 2015 May;86(5):631–645.
- [26] Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008 Sep;35(8 Suppl):286–291.
- [27] Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology*. 2014 Jan;35(1):3–11.

- [28] Van der Weijden GA, van Bommel KM, Renvert S. Implant therapy in partially edentulous, periodontally compromised patients: a review. *Journal of Clinical Periodontology*. 2005 May;32(5):506–511.
- [29] Hardt CRE, Gröndahl K, Lekholm U, Wennström JL. Outcome of implant therapy in relation to experienced loss of periodontal bone support: a retrospective 5-year study. *Clinical Oral Implants Research*. 2002 Oct;13(5):488–494.
- [30] Karoussis IK, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJA, Brägger U, Hämmerle CHF, Lang NP. Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. *Clinical Oral Implants Research*. 2003 Jun;14(3):329–339.
- [31] Ferreira SD, Silva GLM, Cortelli JR, Costa JE, Costa FO. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *Journal of Clinical Periodontology*. 2006 Dec;33(12):929–935.
- [32] Cho-Yan Lee J, Mattheos N, Nixon KC, Ivanovski S. Residual periodontal pockets are a risk indicator for peri-implantitis in patients treated for periodontitis. *Clinical Oral Implants Research*. 2012 Mar;23(3):325–333.
- [33] Atieh MA, Alsabeeha NHM, Faggion CM, Duncan WJ. The frequency of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology*. 2013 Nov;84(11):1586–1598.
- [34] Heitz-Mayfield LJA. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *Journal of Clinical Periodontology*. 2008 Sep;35(8 Suppl):292–304.
- [35] Romanos GE, Javed F, Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL. Peri-implant diseases: a review of treatment interventions. *Dental Clinics of North America*. 2015 Jan;59(1):157–178.
- [36] Kotsovilis S, Karoussis IK, Fourmouis I. A comprehensive and critical review of dental implant placement in diabetic animals and patients. *Clinical Oral Implants Research*. 2006 Oct;17(5):587–599.
- [37] Mombelli A, Cionca N. Systemic diseases affecting osseointegration therapy. *Clinical Oral Implants Research*. 2006 Oct;17 Suppl 2:97–103.

- [38] Sham ASK, Cheung LK, Jin LJ, Corbet EF. The effects of tobacco use on oral health. *Hong Kong Medical Journal = Xianggang Yi Xue Za Zhi*. 2003 Aug;9(4):271–277.
- [39] Charalampakis G, Rabe P, Leonhardt A, Dahlén G. A follow-up study of peri-implantitis cases after treatment. *Journal of Clinical Periodontology*. 2011 Sep;38(9):864–871.
- [40] Serino G, Turri A. Outcome of surgical treatment of peri-implantitis: results from a 2-year prospective clinical study in humans. *Clinical Oral Implants Research*. 2011 Nov;22(11):1214–1220.
- [41] Carcuac O, Derks J, Charalampakis G, Abrahamsson I, Wennström J, Berglundh T. Adjunctive Systemic and Local Antimicrobial Therapy in the Surgical Treatment of Peri-implantitis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of Dental Research*. 2016 Jan;95(1):50–57.
- [42] Sanz M, Chapple IL, Working Group 4 of the VIII European Workshop on Periodontology. Clinical research on peri-implant diseases: consensus report of Working Group 4. *Journal of Clinical Periodontology*. 2012 Feb;39 Suppl 12:202–206.
- [43] Romanos GE, Nentwig GH. Regenerative therapy of deep peri-implant infra-bony defects after CO₂ laser implant surface decontamination. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 2008 Jun;28(3):245–255.
- [44] Roncati M, Lucchese A, Carinci F. Non-surgical treatment of peri-implantitis with the adjunctive use of an 810-nm diode laser. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2013 Nov;17(6):812–815.
- [45] Romanos G, Ko HH, Froum S, Tarnow D. The use of CO₂ laser in the treatment of peri-implantitis. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2009 Jun;27(3):381–386.
- [46] Alshehri FA. The role of lasers in the treatment of peri-implant diseases: A review. *The Saudi Dental Journal*. 2016 Jul;28(3):103–108.

- [47] Esposito M, Grusovin MG, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: treatment of peri-implantitis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012 Jan;1:CD004970.
- [48] Murata M, Tatsumi JI, 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. *Clinical Oral Implants Research*. 2002 Dec;13(6):637–643.
- [49] Arrais JP, Rosa N, Melo J, Coelho ED, Amaral D, Correia MJ, et al. OralCard: a bioinformatic tool for the study of oral proteome. *Archives of Oral Biology*. 2013 Jul;58(7):762–772.
- [50] Schulz BL, Cooper-White J, Punyadeera CK. Saliva proteome research: current status and future outlook. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2013 Sep;33(3):246–259.
- [51] Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, Bencharit S. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *Omics: A Journal of Integrative Biology*. 2011 Jun;15(6):353–361.
- [52] Ruhl S. The scientific exploration of saliva in the post-proteomic era: from database back to basic function. *Expert Review of Proteomics*. 2012;9(1):85–96.
- [53] Rosa N, Marques J, Esteves E, Fernandes M, Mendes VM, Afonso n, et al. Protein Quality Assessment on Saliva Samples for Biobanking Purposes. *Bio-preservation and Biobanking*. 2016 Aug;14(4):289–297.
- [54] Emecen-Huja P, Hasan I, Miller CS. Biologic markers of failing implants. *Dental Clinics of North America*. 2015 Jan;59(1):179–194.
- [55] 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. *Clinical Oral Implants Research*. 2002 Jun;13(3):227–233.

- [56] Dong J, Cui X, Jiang Z, Sun J. MicroRNA-23a modulates tumor necrosis factor- α -induced osteoblasts apoptosis by directly targeting Fas. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013 Dec;114(12):2738–2745.
- [57] Chaturvedi R, Gupta M, Jain A, Das T, Prashar S. Soluble CD40 ligand: a novel biomarker in the pathogenesis of periodontal disease. *Clinical Oral Investigations*. 2015 Jan;19(1):45–52.
- [58] Kim HR, Hwang KA, Park SH, Kang I. IL-7 and IL-15: biology and roles in T-Cell immunity in health and disease. *Critical Reviews in Immunology*. 2008;28(4):325–339.
- [59] Tymkiw KD, Thunell DH, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, et al. Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2011 Mar;38(3):219–228.
- [60] Casado PL, Canullo L, de Almeida Filardy A, Granjeiro JM, Barboza EP, Leite Duarte ME. Interleukins 1 β and 10 expressions in the periimplant crevicular fluid from patients with untreated periimplant disease. *Implant Dentistry*. 2013 Apr;22(2):143–150.
- [61] Sánchez-Siles M, Lucas-Azorin J, Salazar-Sánchez N, Carbonell-Meseguer L, Camacho-Alonso F. Salivary Concentration of Oxidative Stress Biomarkers in a Group of Patients with Peri-Implantitis: A Transversal Study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2016 Oct;18(5):1015–1022.
- [62] Nauseef WM, Olsson I, Arnljots K. Biosynthesis and processing of myeloperoxidase—a marker for myeloid cell differentiation. *European Journal of Haematology*. 1988 Feb;40(2):97–110.
- [63] Gemmell E, Carter CL, Seymour GJ. Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clinical and Experimental Immunology*. 2001 Jul;125(1):134–141.
- [64] Sorsa T, Gursoy UK, Nwhator S, Hernandez M, Tervahartiala T, Leppilähti J, et al. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2016 Feb;70(1):142–163.

- [65] Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007 Mar;1098:216–229.
- [66] Sorsa T, Tervahartiala T, Leppilahti J, Hernandez M, Gamonal J, Tuomainen AM, et al. Collagenase-2 (MMP-8) as a point-of-care biomarker in periodontitis and cardiovascular diseases. Therapeutic response to non-antimicrobial properties of tetracyclines. *Pharmacological Research*. 2011 Feb;63(2):108–113.
- [67] Sorsa T, Mäntylä P, Rönkä H, Kallio P, Kallis GB, Lundqvist C, et al. Scientific basis of a matrix metalloproteinase-8 specific chair-side test for monitoring periodontal and peri-implant health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999 Jun;878:130–140.
- [68] Gonçalves Junior R, Pinheiro AdR, Schoichet JJ, Nunes CHR, Gonçalves R, Bonato LL, et al. MMP13, TIMP2 and TGFB3 Gene Polymorphisms in Brazilian Chronic Periodontitis and Periimplantitis Subjects. *Brazilian Dental Journal*. 2016 Apr;27(2):128–134.
- [69] Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2004 Dec;15(6):457–475.
- [70] Walsh MC, Choi Y. Biology of the TRANCE axis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2003 Aug;14(3-4):251–263.
- [71] Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000 Aug;192(4):463–474.
- [72] Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2001 Oct;21(10):1610–1616.

- [73] Romas E, Bakharevski O, Hards DK, Kartsogiannis V, Quinn JM, Ryan PF, et al. Expression of osteoclast differentiation factor at sites of bone erosion in collagen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2000 Apr;43(4):821–826.
- [74] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & Development*. 1998 May;12(9):1260–1268.
- [75] Renvert S, Widén C, Persson RG. Cytokine and microbial profiles in relation to the clinical outcome following treatment of peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*. 2016 Jul;.
- [76] Di Alberti L, Rossetto A, Albanese M, D'Agostino A, De Santis D, Bertossi D, et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA in healthy bone tissue around implants and in peri-implantitis. *Minerva Stomatologica*. 2013 Jun;.
- [77] 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. *Archives of Oral Biology*. 2012 Jul;57(7):853–864.
- [78] Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, Schneider M, Bansal P, Bridge AJ, et al. UniProtKB/Swiss-Prot, the Manually Annotated Section of the UniProt KnowledgeBase: How to Use the Entry View. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2016;1374:23–54.
- [79] UniProt Consortium. Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic Acids Research*. 2011 Jan;39(Database issue):D214–219.
- [80] Oliveros, J C . VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams.; 2007. Available from: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- [81] 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 Research*. 2013 Jan;41(Database issue):D377–386.

- [82] Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function. *Genome Research*. 2003 Sep;13(9):2129–2141. Available from: <http://genome.cshlp.org/content/13/9/2129>.
- [83] Cho RJ, Campbell MJ. Transcription, genomes, function. *Trends in genetics: TIG*. 2000 Sep;16(9):409–415.
- [84] Tümer C, Aksoy Y, Güncü GN, Nohutcu RM, Kilinc K, Tözüm 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. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2008 Dec;35(12):934–939.
- [85] Luo L, Xie P, Gong P, Tang Xh, Ding Y, Deng LX. Expression of HMGB1 and HMGN2 in gingival tissues, GCF and PICF of periodontitis patients and peri-implantitis. *Archives of Oral Biology*. 2011 Oct;56(10):1106–1111.
- [86] Wang HL, Garaicoa-Pazmino C, Collins A, Ong HS, Chudri R, Giannobile WV. Protein biomarkers and microbial profiles in peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*. 2016 Sep;27(9):1129–1136.
- [87] Lachmann S, Kimmerle-Müller E, Axmann D, Scheideler L, Weber H, Haas R. Associations between peri-implant crevicular fluid volume, concentrations of crevicular inflammatory mediators, and composite IL-1A -889 and IL-1B +3954 genotype. A cross-sectional study on implant recall patients with and without clinical signs of peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*. 2007 Apr;18(2):212–223.
- [88] Aboyousssef H, Carter C, Jandinski JJ, Panagakos FS. Detection of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases in implant crevicular fluid. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 1998 Oct;13(5):689–696.
- [89] Panagakos FS, Aboyousssef H, Dondero R, Jandinski JJ. Detection and measurement of inflammatory cytokines in implant crevicular fluid: a pilot study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 1996 Dec;11(6):794–799.

- [90] Laine ML, Leonhardt A, Roos-Jansåker AM, Peña AS, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, et al. IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*. 2006 Aug;17(4):380–385.
- [91] Kivelä-Rajamäki MJ, Teronen OP, Maisi P, Husa V, Tervahartiala TI, Pirilä EM, et al. Laminin-5 gamma2-chain and collagenase-2 (MMP-8) in human peri-implant sulcular fluid. *Clinical Oral Implants Research*. 2003 Apr;14(2):158–165.
- [92] Kivelä-Rajamäki 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. *Journal of Periodontal Research*. 2003 Dec;38(6):583–590.
- [93] 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. *Journal of Prosthodontic Research*. 2012 Oct;56(4):249–255.
- [94] Borsani E, Salgarello S, Mensi M, Boninsegna R, Stacchiotti A, Rezzani R, et al. Histochemical and immunohistochemical evaluation of gingival collagen and metalloproteinases in peri-implantitis. *Acta Histochemica*. 2005;107(3):231–240.
- [95] Ma J, Kittl U, Hanemaaijer R, Teronen OP, Sorsa TA, Nattah S, et al. Gelatinase B is associated with peri-implant bone loss. *Clinical Oral Implants Research*. 2003 Dec;14(6):709–713.
- [96] Özçakır Tomruk C, Chiquet M, Mericske-Stern R. Tenascin-C and matrix metalloproteinase-9 levels in crevicular fluid of teeth and implants. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2012 Oct;14(5):672–681.
- [97] Liskmann S, Zilmer M, Vihalemm T, Salum O, Fischer K. Correlation of peri-implant health and myeloperoxidase levels: a cross-sectional clinical study. *Clinical Oral Implants Research*. 2004 Oct;15(5):546–552.
- [98] 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. *Journal of Clinical Periodontology*. 2006 Apr;33(4):302–308.

- [99] Yamalik N, Günday S, Kilinc K, Karabulut E, Berker E, Tözüm TF. Analysis of cathepsin-K levels in biologic fluids from healthy or diseased natural teeth and dental implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2011 Oct;26(5):991–997.
- [100] Yamalik N, Günday S, Uysal S, Kiliç K, Karabulut E, Tözüm TF. Analysis of cathepsin-K activity at tooth and dental implant sites and the potential of this enzyme in reflecting alveolar bone loss. *Journal of Periodontology*. 2012 Apr;83(4):498–505.
- [101] Kuula H, Salo T, Pirilä E, Hagström 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. *Archives of Oral Biology*. 2008 Feb;53(2):175–186.
- [102] Duarte PM, de Mendonça AC, Máximo MBB, Santos VR, Bastos MF, Nociti Júnior FH. Differential cytokine expressions affect the severity of peri-implant disease. *Clinical Oral Implants Research*. 2009 May;20(5):514–520.
- [103] 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. *Clinical Oral Implants Research*. 2013 Oct;24(10):1110–1116.
- [104] Arikan F, Buduneli N, Kütükçüler N. Osteoprotegerin levels in peri-implant crevicular fluid. *Clinical Oral Implants Research*. 2008 Mar;19(3):283–288.
- [105] Arikan F, Buduneli N, Lappin DF. C-telopeptide pyridinoline crosslinks of type I collagen, soluble RANKL, and osteoprotegerin levels in crevicular fluid of dental implants with peri-implantitis: a case-control study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2011 Apr;26(2):282–289.
- [106] Duarte PM, de Mendonça AC, Máximo MBB, Santos VR, Bastos MF, Nociti FH. Effect of anti-infective mechanical therapy on clinical parameters and cytokine levels in human peri-implant diseases. *Journal of Periodontology*. 2009 Feb;80(2):234–243.

- [107] Monov G, Strbac GD, Baron M, Kandler B, Watzek G, Gruber R. Soluble RANKL in crevicular fluid of dental implants: a pilot study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2006;8(3):135–141.
- [108] Venza I, Visalli M, Cucinotta M, De Grazia G, Teti D, Venza M. Proinflammatory gene expression at chronic periodontitis and peri-implantitis sites in patients with or without type 2 diabetes. *Journal of Periodontology*. 2010 Jan;81(1):99–108.
- [109] Liskmann S, Vihalemm T, Salum O, Zilmer K, Fischer K, Zilmer M. Correlations between clinical parameters and interleukin-6 and interleukin-10 levels in saliva from totally edentulous patients with peri-implant disease. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2006 Aug;21(4):543–550.
- [110] 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. *Archives of Oral Biology*. 2011 Aug;56(8):823–828.
- [111] 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. *Archives of Oral Biology*. 2013 May;58(5):523–529.
- [112] Bullon P, Fioroni M, Goteri G, Rubini C, Battino M. Immunohistochemical analysis of soft tissues in implants with healthy and peri-implantitis condition, and aggressive periodontitis. *Clinical Oral Implants Research*. 2004 Oct;15(5):553–559.
- [113] Borsani E, Salgarello S, Stacchiotti A, Mensi M, Boninsegna R, Ricci F, et al. Altered immunolocalization of heat-shock proteins in human peri-implant gingiva. *Acta Histochemica*. 2007;109(3):221–227.
- [114] Schubert U, Kleber BM, Strietzel FP, Dörfling P. CrossLaps and beta-glucuronidase in peri-implant and gingival crevicular fluid. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2001 Apr;16(2):252–258.
- [115] Curtis DA, Kao R, Plesh O, Finzen F, Franz L. Crevicular fluid analysis around two failing dental implants: a clinical report. *Journal of Prosthodontics: Official Journal of the American College of Prosthodontists*. 1997 Sep;6(3):210–214.

- [116] 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 Diseases*. 2010 Nov;16(8):831–838.
- [117] Katz J, Yoon TYH, Mao S, Lamont RJ, Caudle RM. Expression of the receptor of advanced glycation end products in the gingival tissue of smokers with generalized periodontal disease and after nornicotine induction in primary gingival epithelial cells. *Journal of Periodontology*. 2007 Apr;78(4):736–741.
- [118] Javed F, Al-Rasheed A, Almas K, Romanos GE, Al-Hezaimi K. Effect of cigarette smoking on the clinical outcomes of periodontal surgical procedures. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2012 Jan;343(1):78–84.
- [119] Gruica B, Wang HY, Lang NP, Buser D. Impact of IL-1 genotype and smoking status on the prognosis of osseointegrated implants. *Clinical Oral Implants Research*. 2004 Aug;15(4):393–400.
- [120] Queiroz DA, Cortelli JR, Holzhausen M, Rodrigues E, Aquino DR, Saad WA. Smoking increases salivary arginase activity in patients with dental implants. *Clinical Oral Investigations*. 2009 Sep;13(3):263–267.
- [121] Akalin FA, Baltacioğlu E, Alver A, Karabulut E. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2007 Jul;34(7):558–565.
- [122] Mousavi Jazi M, Sadeghi Pour Rodsari HR, Mirmiran F. Level of Oxidative Stress Markers in Peri-Implant Crevicular Fluid and Their Correlation with Clinical Parameters. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*. 2015 May;12(5):340–346.
- [123] Boström EA, Kindstedt E, Sulniute R, Palmqvist P, Majster M, Holm CK, et al. Increased Eotaxin and MCP-1 Levels in Serum from Individuals with Periodontitis and in Human Gingival Fibroblasts Exposed to Pro-Inflammatory Cytokines. *PloS One*. 2015;10(8):e0134608.
- [124] Yin X, Bunn CL, Bartold PM. Detection of tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor 2(PAI-2) in gingival crevicular fluid from he-

althy, gingivitis and periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*.
2000 Mar;27(3):149–156.

