



UNIVERSIDADE
CATOLICA
PORTUGUESA

INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES SALIVARES DE
DOENÇA PERIODONTAL EM PACIENTES COM GENGIVITE**

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

Por:

Beatriz Patrício Serra

Viseu, 2015



UNIVERSIDADE
CATÓLICA
PORTUGUESA

INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE

IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES SALIVARES DE DOENÇA PERIODONTAL EM PACIENTES COM GENGVITE

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

Orientadora: Professora Doutora Maria José Correia

Co-Orientador: Mestre Tiago Marques

Por:

Beatriz Patrício Serra

Viseu, 2015

The future doesn't lie ahead of you,
waiting to happen – it lies deep inside of you,
waiting to be discovered.

(Autor desconhecido)

Aos meus Pais e à minha irmã,
pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria José Correia, pela orientação e sabedoria que me transmitiu ao longo desta jornada. E por se lembrar das minhas amêndoas preferidas.

À Professora Doutora Marlene Barros, Dr. Nuno Rosa e Dr. Tiago Marques pelos conselhos e pelos conhecimentos transmitidos, não só agora mas ao longo de todo o percurso académico.

À Mónica, ao Eduardo e à Jéssica pela boa disposição e interminável prontidão em ajudar, sem eles este trabalho não seria o mesmo.

Ao André pelo apoio incondicional.

À minha binómia e amiga Andreia Hortênsio.

RESUMO

Sumário: A Gengivite é uma condição inflamatória reversível do periodonto causada por uma disbiose no biofilme bacteriano que estimula mecanismos imunológicos do hospedeiro. A inflamação é fisiológica nos estados inicial e precoce, mas a interação dos fatores de virulência bacterianos com as células imunológicas convertem-na numa condição patológica irreversível, a Periodontite. A quantificação de marcadores do biofluido salivar de pacientes com Gengivite poderá elucidar os mecanismos que levam a esta alteração. As quimiocinas CCL3 e CCL13 são moléculas mediadoras da resposta imune, pois recrutam células de defesa no periodonto, e estão propostas enquanto biomarcadores de risco preditivos da doença periodontal.

Objetivo: Quantificar as CCL3 e CCL13 *in vivo* em pacientes com Gengivite e pacientes saudáveis. Avaliar se estes biomarcadores identificam a presença de inflamação periodontal, a sua extensão, o potencial de progressão da doença e se permitem o diagnóstico salivar diferencial da Doença Periodontal em pacientes com Gengivite.

Material e Métodos: 48 indivíduos foram sujeitos a exame clínico intra-oral, e consoante os parâmetros clínicos Periodontais foram agrupados em dois grupos (S e G). Foram sujeitos ao preenchimento de um questionário sobre historial médico, hábitos alimentares e qualidade de vida para melhor caracterização dos grupos de estudo. Foram posteriormente submetidos a recolha de amostras de saliva para quantificação das CCL3 e CCL13 por tecnologia Multiplex.

Resultados: As CCL3 e CCL13 foram detectadas na saliva em baixas concentrações, e os valores no grupo G foram maiores do que no grupo S, não tendo sido as diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$). Ao correlacionar os valores de BOP e IP dos grupos S e G com a concentração das CCL, os valores encontrados não foram estatisticamente diferentes ($p>0,05$).

Conclusões: Os resultados obtidos não permitem propor a CCL3 e CCL13 como bons biomarcadores para avaliar o potencial de progressão da Doença Periodontal em pacientes com Gengivite.

PALAVRAS CHAVE: Doença Periodontal, Gengivite, Resposta Inflamatória, Quimiocinas, Saliva, Biomarcadores salivares, Diagnóstico salivar, Multiplex.

ABSTRACT

Summary: Gingivitis is a reversible inflammatory condition of the periodontium caused by a dysbiosis in bacterial biofilms, which stimulates the host immune mechanisms. The inflammatory condition is physiological in the initial and premature states, but the interaction between bacterial virulence factors and immune cells convert it in an irreversible pathological condition, Periodontitis. The quantification of salivary biofluid markers of patients with Gingivitis can elucidate the mechanisms that lead to this change. The chemokine CCL3 and CCL13 are mediator molecules of the immune response, as they recruit the periodontium defense cells, and are proposed as biomarkers of predictive risk for Periodontal Disease.

Objective: Quantifying CCL3 and CCL13 *in vivo* in patients with Gingivitis and in healthy patients. Evaluate if those biomarkers identify the presence of periodontal inflammation, its extension, the potential of disease progression and also if they allow salivary differential diagnosis of Periodontal Disease in patients with Gingivitis.

Material and Methods: 48 individuals were subjected to an intra-oral clinical exam, and according with periodontal clinical parameters, were grouped in two groups (S and G). They were subjected to a questionnaire about their medical history, eating habits and life quality, to achieve a better characterization of the study groups. They were subsequently submitted to collection of saliva samples for quantification of CCL3 and CCL 13, using Multiplex technology.

Results: CCL3 and CCL13 were detected in low concentrations on saliva, and the values registered in the G group were higher than the values registered in the S group, without statistically significant difference ($p > 0,05$). By correlating the values of BOP and PI of the S and G groups, with the CCL concentration, the values identified were not statistically different ($p > 0,05$).

Conclusions: The results do not allow the suggestion of CCL3 and CCL13 as biomarkers to evaluate the progression potential of Periodontal Disease in patients with Gingivitis

KEY-WORDS: Periodontal Disease, Gingivitis, Inflammatory Response, Chemokine, Saliva, Salivary Biomarkers, Salivary Diagnosis, Multiplex.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. A DOENÇA PERIODONTAL	3
2.1. Definição	3
2.2. Classificação	3
2.3. Diagnóstico	4
3. A REGULAÇÃO IMUNOLÓGICA DA DOENÇA PERIODONTAL	7
3.1. Mecanismos da resposta imunológica	9
3.1.1. Moléculas da resposta imunológica	11
3.1.2. Células da resposta imunológica	14
3.2. O biofilme oral e a disbiose microbiana	20
3.2.1. <i>P. Gingivalis</i> : o patógeno chave na disbiose microbiana	21
3.3. Reconhecimento Inato dos microrganismos Periodontais	22
3.4. Progressão da lesão inflamatória nos tecidos Gengivais/Periodontais	23
3.5. A gengivite como inflamação aguda vs resposta do hospedeiro	26
4. A SALIVA	31
4.1. Composição, função e características	31
4.2. Diagnóstico salivar e implicação na Doença Periodontal	32
4.3. Biomarcadores salivares propostos para a gengivite	33
5. PROBLEMA EM ESTUDO	35
6. METODOLOGIA	37
6.1. Estabelecimento dos grupos de Estudo	37
6.2. Exame Oral e Diagnóstico Periodontal	38
6.3. Calibração dos Examinadores	39
6.4. Colheita das amostras de Saliva	40
6.5. Processamento e armazenamento das amostras	41
6.6. Controlo de qualidade das Amostras	43
6.7. Análise da Presença e Quantificação de Biomarcadores	44
6.8. Análise Estatística	44

6.9. Fluxograma.....	45
7. RESULTADOS	47
7.1. Parâmetros Demográficos e clínicos	47
7.2. Perfil Proteico dos grupos de Estudo.....	49
7.3. Quantificação de CCL3 e CCL13	50
7.4. Correlação entre as concentrações de CCL3 e CCL13 com os parâmetros clínicos.....	53
8. DISCUSSÃO	55
9. CONCLUSÃO	59
10. BIBLIOGRAFIA	61
11. APÊNDICE.....	75
12. ANEXOS	87

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

(G)	Gengivite
(P)	Periodontite
(S)	Saudáveis
BOP	<i>Bleeding on probing</i> (hemorragia à sondagem)
CAL	<i>Clinical attachment loss</i> (perda de inserção clínica)
CCL3	<i>Chemokine</i> (C-Cmotif) ligand 3
CCL13	<i>Chemokine</i> (C-Cmotif) ligand 13
CCL20	<i>Chemokine</i> (C-Cmotif) ligand 20
CDs	Células dendríticas
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4</i>
DEFA3	Defensina 3 (<i>neutrophil defensin 3</i>)
DP	Doença Periodontal
FCG	Fluido Crevicular Gengival
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
IFN- γ	Interferão gama
IL	Interleucina
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MAP	<i>Mitogen-activated Protein</i>
MCP-4	<i>Monocyte chemoattractant protein 4</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage inflammatory protein 1 alpha</i>
MMP	Metaloproteinase da Matriz
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
OPG	Osteoprotegerina
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PD	<i>Periodontal depth</i> (profundidade de sondagem)
PGE ₂	Prostaglandina E2
PMNs	Leucócitos Polimorfonucleares
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
RANK	Recetor ativador do fator- κ B nuclear
RANKL	Recetor ativador do ligando fator- κ B

TGF- β	Fator de crescimento β
Th0	Células T <i>helper</i> CD4 naive
Th17	Células T <i>helper</i> 17
TLR	Recetor <i>toll-like</i>
TNF- α	Fator de necrose Tumoral alfa
Treg	Célula T reguladora

1. INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal (DP) é uma das doenças inflamatórias mais comuns na espécie Humana (1). Por ser uma patologia multifatorial, ao longo das últimas duas décadas tem sido estudada por investigadores de várias áreas, que tentam esclarecer os mecanismos moleculares subjacentes ao seu desenvolvimento, exacerbação e progressão para formas mais avançadas da doença. As tecnologias Ómicas têm sido aplicadas ao estudo da DP e das moléculas envolvidas, estando a análise dos resultados dependente dos desenvolvimentos da Biomedicina Computacional, que se afirma como uma ferramenta fundamental para extrair da grande quantidade de dados o significado biológico.

Do interesse e estudo da DP como modelo de infeção polimicrobiana e de resposta inflamatória alterada, têm sido produzidos muitos resultados propondo várias moléculas como biomarcadores suscetíveis de ser usados no diagnóstico, prognóstico e resposta à terapêutica nesta patologia. Rosa *et al* (2014) reviram a literatura dos biomarcadores propostos para o espectro da DP e selecionaram os marcadores que seriam funcionalmente mais elucidativos da resposta inflamatória nesta doença. Este trabalho experimental pretende verificar o potencial de biomarcadores salivares, identificados *in silico* por Rosa *et al* (2014) para a Gengivite. O objetivo final é verificar a exequibilidade de um diagnóstico salivar da DP em pacientes com Gengivite, quantificando os biomarcadores salivares em doença e em saúde.

2. A DOENÇA PERIODONTAL

2.1. Definição

O termo “Doença Periodontal” refere-se genericamente às doenças inflamatórias que atingem o conjunto dente-periodonto conhecidas como Gengivite e Periodontite (2,3). Estas doenças são causadas por distúrbios nos processos de homeostasia por numerosas espécies bacterianas encontradas na placa subgengival, e são modificadas por fatores ambientais (como o tabaco, genética, doenças sistémicas, obesidade, gravidez, medicação e nutrição) (4–6), e factores do indivíduo (idade, doenças sistémicas como a Diabetes, suscetibilidade genética e sistema imune do Hospedeiro) (5). Depois da cárie, esta é a segunda doença oral que mais afecta a população mundial com elevadas taxas de prevalência (7,8).

2.2. Classificação

A classificação correntemente utilizada dos vários tipos de Doenças Periodontais é a definida pelo *International Workshop for Classification of Periodontal Diseases and Conditions* de 1999 (9). Esta inclui os sete tipos gerais de Doenças Periodontais Induzidas por Placa: 1) Gengivite, 2) Periodontite Crónica, 3) Periodontite Agressiva, 4) Periodontite como manifestação de Doenças Sistémicas, 5) Doenças Periodontais Necrosantes, 6) Abscessos Periodontais e 7) Periodontite associada a lesões Endodônticas.

A Gengivite é uma condição inflamatória aguda superficial, não destrutiva e reversível dos tecidos gengivais (10). É causada pela acumulação de placa bacteriana, sem existir perda de tecido conjuntivo ou inserção (11,12). É modificada por muitos fatores, como o tabaco, algumas drogas/fármacos e mudanças hormonais (2). Clinicamente, é caracterizada pela presença de vermelhidão e edema do tecido gengival, hemorragia à sondagem,

modificação do contorno e consistência gengivais, presença de cálculo ou placa, e sem evidência radiológica de perda de osso crestal (13).

Contrariamente à Gengivite, a Periodontite é uma condição inflamatória crônica destrutiva, caracterizada pela perda irreversível de osso alveolar, ligamento periodontal e gengiva (10). A Periodontite é igualmente influenciada pela resposta inflamatória e imune do indivíduo, e no geral, evolui de uma condição de Gengivite em indivíduos suscetíveis, não sendo o contrário necessariamente verdade, uma vez que a Gengivite pode não progredir para a forma destrutiva da doença (12,14). Quando a Periodontite não é tratada podem ocorrer as seguintes situações: aumento da mobilidade dentária, alterações na mastigação e dor, perda dentária (5). Pode ainda associar-se ao desenvolvimento ou exacerbação de doenças sistêmicas como artrite Reumatóide, doenças respiratórias e cardiovasculares (15), síndromes metabólicas e Diabetes (16).

2.3. Diagnóstico

O diagnóstico da DP é efetuado através de inspeção visual dos tecidos gengivais, medição da profundidade da bolsa periodontal e da perda de inserção, presença de hemorragia à sondagem e avaliação de outros parâmetros clínicos (como as recessões gengivais, mobilidade dentária e envolvimento de furca (11) e anomalias oclusais/hábitos parafuncionais (17)). As radiografias (panorâmicas e periapicais) permitem a observação do nível de osso e são um meio complementar de diagnóstico da DP.

Todos estes dados estão, no entanto, apenas relacionados com o passado da doença, não dizendo nada a respeito da doença atual nem da sua patogénese (18,19). Assim, é necessário o recurso a novos meios de diagnóstico que possam detetar a atividade da doença, prever o seu potencial de progressão e avaliar a resposta à terapia periodontal (18,19).

A inflamação na Gengivite e Periodontite é um dos parâmetros mais importantes no diagnóstico, pois pode estar também associada a sintomas de inflamação noutras áreas corporais (12). Um tecido gengival inflamado apresenta-se edemaciado, sangrante e com os bordos geralmente de cor vermelha. A ausência de dor espontânea na DP é uma das razões pela qual os pacientes não procuram tratamento, quer num estágio inicial ou mais avançado da doença, o que permite a sua progressão para um estágio irreversível (12).

3. REGULAÇÃO IMUNOLÓGICA NA DOENÇA PERIODONTAL

Até muito recentemente, o estudo da etiologia da DP focou-se no papel da infecção bacteriana, contudo, a resposta do hospedeiro tem sido cada vez mais apontada como o principal fator que comanda a doença (16). É sabido que envolve várias células especializadas da resposta imune e moléculas sinalizadoras, que participam em muitos mecanismos de sinalização. No entanto, continua a ser aceite que a etiologia da DP se deve à acumulação de bactérias na forma de um biofilme disbiótico na margem dento-gengival, o que dá início à resposta imunitária (5,17,19) originando a inflamação. A inflamação é a resposta fisiológica do hospedeiro a uma agressão (7), e é crucial para a manutenção da homeostasia dos tecidos (20).

A resposta inicial do hospedeiro à placa bacteriana é uma lesão inflamatória local que ativa o sistema imunológico inato, o que resulta na libertação de uma série de citocinas e outros mediadores, e na propagação da inflamação e recrutamento de células inflamatórias no tecido gengival (16). A propagação da inflamação no tecido conjuntivo adjacente origina a sua destruição, bem como do osso alveolar (16).

Embora pareçam semelhantes, a resposta inflamatória nos tecidos periodontais é bastante diferente das observadas no resto do corpo (16,21). Isto acontece devido às especificidades anatómicas do periodonto e ao carácter único da infecção. O tecido conjuntivo do periodonto está separado da cavidade oral por um fino epitélio juncional, e possui uma dinâmica de fluidos que permitem o fluxo de toxinas bacterianas e mediadores inflamatórios (16). Os processos de defesa do periodonto ocorrem em resposta a um comunidade de micróbios que residem na superfície dentária, na forma de biofilme (22), sendo esta a grande diferença de outras infeções, em que o hospedeiro lida apenas com um organismo (23).

Alguns microrganismos presentes na placa bacteriana, como a *P. gingivalis*, são capazes de modificar o microambiente circundante para a sua sobrevivência. A disbiose microbiana provocada por estes microrganismos é um acontecimento crítico para a mudança de saúde Periodontal para doença (24). A *P. gingivalis* é um patogénico chave na disbiose que ocorre na placa bacteriana, pois possui uma variedade de fatores de virulência como a camada de Lipopolissacarídeos (LPS), fímbrias maiores e menores, ceramidas, *gingipains*, entre outros. Os *gingipains* são proteases de cisteína que fazem a clivagem de uma variedade de proteínas incluindo imunoglobulinas, citocinas, moléculas de adesão celular e componentes do complemento (25). As *gingipains* estão aptas a modificar o ambiente inflamatório local, adequando-o ao mais favorável para a *P. gingivalis* (26). O hospedeiro desenvolve um desequilíbrio imunológico que é consequência da resposta imune, efeitos patogénicos e infiltração de sub-tipos específicos de células T que alteram o equilíbrio localmente, no sentido da promoção da inflamação, o que acaba por levar à destruição dos tecidos periodontais (24). Um exemplo da desregulação das respostas imunes do hospedeiro é a Periodontite Crónica (27). Hoje sabe-se que apesar da infeção bacteriana iniciar a DP, é a desregulação da resposta imune que determina a progressão da lesão e a extensão da destruição tecidular (27).

Para melhor compreensão da influência do biofilme oral disbiótico na etiologia da DP, são resumidos de seguida os mecanismos da resposta imunológica.

3.1.Mecanismos da resposta imunológica

Mesmo num estado de saúde geral, os tecidos periodontais apresentam sempre um infiltrado leucocitário (em baixo grau) devido à presença constante do biofilme oral nos tecidos adjacentes (28). O infiltrado estimula uma resposta fisiológica constante entre as bactérias do biofilme e as células de defesa do hospedeiro (28). Num estado de doença, os tecidos periodontais exibem um *turn-over* tecidular e atividade celular aumentados, que estão associados às células inflamatórias infiltradas (29).

Nas várias possibilidades da resposta inflamatória participam frequentemente as mesmas células e moléculas, promovendo a iniciação e execução da resposta imunitária (Figura 1). As células que participam na resposta podem ser classificadas em 3 categorias (30).

As primeiras células que contactam com os microrganismos são as células epiteliais, os macrófagos e as células dendríticas (CDs). Após o contacto e internalização dos microrganismos, os antigénios bacterianos são processados e apresentados pelos linfócitos, macrófagos e CDs (31). São estas as células apresentadoras de antigénios que induzem os linfócitos a diferenciarem-se em dois subtipos: linfócitos T e linfócitos B (7) as principais células efetoras da resposta imune.

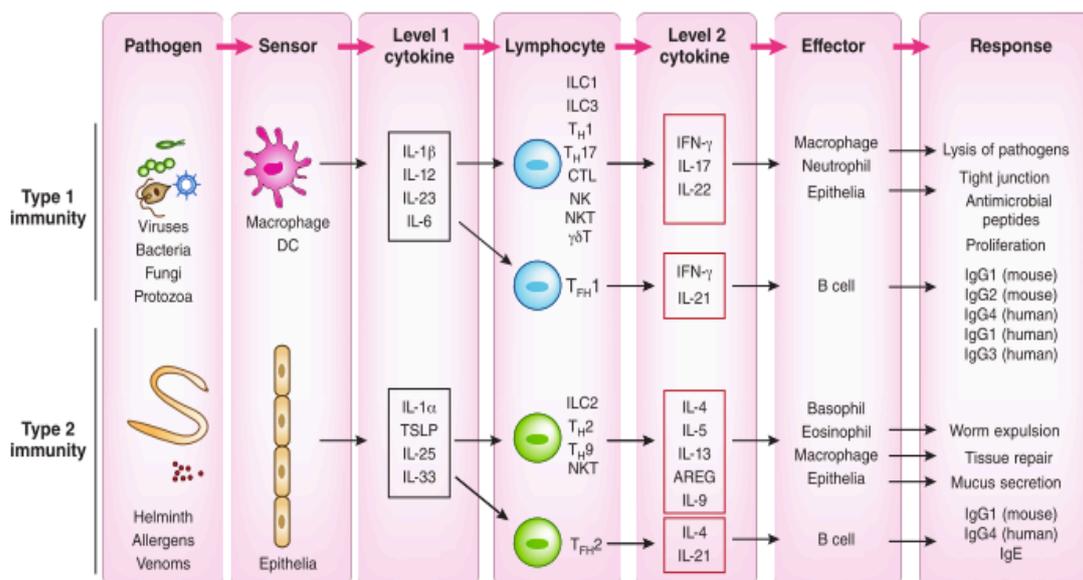


Figura 1 - Os dois tipos de resposta imune. As respostas imunes são orquestradas por três tipos de células: os “sensores”, que detetam os microrganismos patogênicos e secretam citocinas de nível 1; os linfócitos residentes, que secretam citocinas de nível 2 como resposta às citocinas do nível anterior; os efetores, que respondem às citocinas de nível 2 eliminando o microrganismo patogênico. Traduzido e adaptado de Iwasaki *et al* (30).

O processo da resposta é iniciado por células que funcionam como sensores de infecção ou dano. Estas células expressam PRR (*Pattern recognition receptors*) e outros meios de reconhecimento para microrganismos, parasitas, alérgenos, toxinas e qualquer outro estímulo que desencadeie uma resposta imune (30). As células que funcionam como sensores incluem as CDs e macrófagos para a resposta imune tipo 1, e células epiteliais e mastócitos para a resposta imune tipo 2 (Figura 1). Os diferentes tipos de reconhecimento pelo sistema imune inato operam nestas células para induzir a produção de citocinas de nível 1. Estas incluem interleucina (IL)-12, IL-23, IL-6 e IL-1β para a resposta imune tipo 1. Estas citocinas atuam na segunda categoria de células, composta por várias populações de linfócitos, que produzem citocinas de nível 2. Estas incluem Interferão gama (IFN-γ), IL-17, IL-22 para a resposta imune tipo 1. IL-21 é comum aos dois tipos de resposta imune, tipo 1 e tipo 2. As citocinas de nível 2 atuam na terceira categoria de células, as efetoras da resposta imune, que incluem macrófagos, neutrófilos, células epiteliais, eosinófilos e basófilos, e células B (30). Estas células desempenham várias funções, entre as quais a defesa, expulsão e

eliminação de microrganismos patogénicos, produção de anticorpos e reparação tecidual.

3.1.1. Moléculas da resposta imunológica

A orquestração dos eventos que decorrem durante a resposta imunológica é feita por mediadores químicos que são produzidos pelas várias células envolvidas, e para os quais há recetores específicos nas células do sistema imune (7).

3.1.1.1 Citocinas e quimiocinas

As citocinas e quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular que iniciam e perpetuam a inflamação, e regulam também a amplitude e duração da resposta (32).

As citocinas são produzidas pelas células residentes, como as células epiteliais, fibroblastos e fagócitos (neutrófilos e macrófagos) nas fases aguda e crónica inicial da inflamação, e são também produzidas pelos linfócitos nas lesões estabelecidas e avançadas (33).

Após o reconhecimento e apresentação do microrganismo às células apropriadas, as citocinas da resposta inata são as primeiras a ser secretadas na patogénese da DP: TNF- α , IL-1 β e IL-6 (7). As duas últimas são citocinas pró-inflamatórias características da resposta inata, e estão associadas à migração celular durante a inflamação e à osteoclastogénese (34).

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas que participam na migração celular fagocítica ao local da infeção (32), e são sintetizadas por uma variedade de células (leucócitos e células epiteliais). Os leucócitos estão particularmente dependentes das quimiocinas para o seu correto funcionamento, pois estas guiam as células imunes efetoras para o local da infeção/inflamação e coordenam interações entre estas células (35). Ao fazer

isto, as quimiocinas promovem uma interação entre a imunidade inata e adaptativa pois moldam o tipo de resposta (35).

A interação entre quimiocina e recetor assegura uma distribuição adequada dos leucócitos sob condições fisiológicas e inflamatórias (36).

As quimiocinas são polipéptidos secretados cujas massas moleculares variam entre os 5 e os 20 kDa, e são categorizadas em 4 subfamílias com base na posição relativa dos resíduos de cisteína: C, CC, CXC e CX₃C (27).

No geral, as quimiocinas CXC ativam principalmente os neutrófilos, enquanto que as do tipo CC são essencialmente quimiotáticas para os monócitos/macrófagos e linfócitos. São também fundamentais na transição da inflamação aguda para crónica, pois desempenham uma função importante na mudança dos macrófagos M1 para M2 (27). Estas quimiocinas são ainda cruciais no desenvolvimento da imunidade adaptativa, pois propagam o recrutamento dos linfócitos e apresentação de antígenos. As que são produzidas localmente podem controlar tanto a produção como a expressão dos recetores de quimiocinas, que por seu turno regulam a cinética e a composição do infiltrado leucocitário (36). As quimiocinas participam também no metabolismo ósseo ao transmitir sinais aos precursores dos osteoblastos e osteoclastos (27).

A produção seletiva de quimiocinas poderá determinar a localização espacial das células inflamatórias nos tecidos periodontais, otimizando a resposta do hospedeiro (36). Pode também contribuir para a infiltração de leucócitos na área inflamada e infetada, limitando assim o dano tecidual (36). As células presentes no periodonto (como fibroblastos, células epiteliais e endoteliais) são capazes de produzir quimiocinas em resposta aos produtos bacterianos ou moléculas inflamatórias (37,38). Contudo, os fatores de virulência de bactérias como a *P. gingivalis* são capazes de interferir com este processo (39), como é mencionado mais à frente. Uma das evidências que suportam o papel dos níveis alterados das quimiocinas na DP é o fato de haver resultados experimentais que demonstraram que os níveis de quimiocinas no

Fluido Crevicular Gengival (FCG) diminuíram após tratamento periodontal (36).

As quimiocinas do grupo CC atuam principalmente nos monócitos e linfócitos sem afetar os neutrófilos (40). Neste grupo existem as quimiocinas CCL3 e CCL13, que estão implicadas no recrutamento de monócitos (27,41), entre outras funções descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Exemplos de quimiocinas envolvidas no recrutamento/ativação de células na resposta inflamatória.

Quimiocina	Código Uniprot	Outro Nome	Recetor	Função imune
CCL3	P10147	MIP-1 α	CCR1 CCR5	Recrutamento de monócitos (ação quimiotática), ação anti-apoptótica dos macrófagos (27,41); migração de macrófagos e células NK; interações entre CDs e células T (35).
CCL13	Q99616	MCP-4	CCR2 CCR3 CCR5	Recrutamento de monócitos (41); respostas Th2 (35).

A CCL3 ou MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein 1 alpha*) liga-se ao receptor 1 (CCR1) e 5 (CCR5) com grande afinidade, e na Periodontite Crónica está aumentada 18x, o que contribui para a presença de macrófagos devido ao seu efeito anti-apoptótico. Isto promove o estabelecimento de uma resposta inflamatória crónica (41). A CCL3 está envolvida no metabolismo ósseo e induz a migração e ativação dos osteoclastos (42), mais especificamente, a adesão dos osteoclastos aos osteoblastos primários, sugerindo a função desta quimiocina na regulação e interação entre estes dois tipos de células (36). É ainda descrita como um fator de diferenciação osteoclástica (36), e a sua presença nas lesões periodontais poderá exacerbar a severidade da DP (27).

Os recetores CCR1, CCR2 e CCR5 são também expressos em monócitos/macrófagos, e o CCR5 é expressado preferencialmente nos linfócitos Th1 (36). A expressão dos recetores CCR3 está relatada em

basófilos, linfócitos T, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e células endoteliais (43).

A CCL13 ou MCP-4 (*monocyte chemoattractant protein 4*) é uma quimiocina que atrai quimicamente monócitos e eosinófilos, estimulando também a libertação de histamina pelos basófilos (44). É também quimioattractiva das células Th2 (36). Contribui para a migração dos eosinófilos e induz a inflamação (45) quando se liga ao recetor CCR3. A CCL13 é relatada em muitos estudos como estando envolvida em condições patológicas inflamatórias como a artrite Reumatóide, aterosclerose, asma e infeção renal aguda (46–49), e obesidade (50). Mais recentemente, foi apontada como um novo marcador da Periodontite Crónica, estando correlacionada com a severidade da doença (50).

3.1.2. Células da resposta imunológica

As principais células efetoras, as suas funções e implicações na DP são descritas de seguida. As CDs apesar terem sido inicialmente descritas sobretudo como células sensoras, têm visto o seu papel revisto e sido encontradas funções efetoras, e por isso são também descritas nesta seção (51).

3.1.1.2 Neutrófilos

Os neutrófilos ou Leucócitos Polimorfonucleares (PMNs) desempenham um papel muito importante na DP, pois têm uma influência tanto protetora como destrutiva (52). Os PMNs são as células predominantes (e as primeiras) da resposta inata em lesões de Gengivite precoce (53).

O envolvimento dos neutrófilos na patogénese de uma doença crónica como a Periodontite pode parecer inesperado, uma vez que este tipo de mediador está geralmente associado às respostas agudas (39). Contudo, é cada vez

mais reconhecido o papel dos neutrófilos em doenças inflamatórias crônicas, como a psoríase e a artrite Reumatóide (54,55). Além disso, ainda não está claro se a natureza crônica da Periodontite representa um processo patológico constante ou uma série persistente de episódios agudos (*bursts*) separados por períodos de remissão (56).

Os neutrófilos podem causar destruição periodontal através da libertação de enzimas (como as metaloproteinases ou MMP), ou substâncias citotóxicas (57,58), e podem também induzir a reabsorção óssea através dos osteoclastos, e da expressão de RANKL (59). Podem ainda estar implicados em efeitos mais destrutivos ao mediar o recrutamento quimiotático de células CD4⁺ Th17 que produzem IL-17 (60).

3.1.1.3 Macrófagos

Os macrófagos residentes são células amplamente distribuídas, indispensáveis na homeostasia e defesa do hospedeiro (7). São também células apresentadoras de antígenos e células fagocíticas, de linhagem mielóide, que expressam moléculas classe II do complexo de histocompatibilidade para induzir a atividade co-estimulatória nas células T (7).

Os macrófagos são a primeira linha de defesa na invasão dos patógenos bacterianos (61). Dependendo do estímulo, os macrófagos estimulados comportam-se de maneiras diferentes: funcionam como sensores quando ativados pelos PRR e secretam citocinas de nível 1 para estimular respostas dos linfócitos locais; funcionam como efetoras quando estimuladas pelas citocinas de nível 2 produzidas pelos linfócitos (por exemplo IFN- γ), induzindo respostas antimicrobianas e fagocíticas muito robustas (30).

Ao apresentarem antígenos, os macrófagos são importantíssimos na ativação das células T e na polarização da resposta imune adaptativa/adquirida (61).

Existem 3 populações de macrófagos ativados identificados: clássico ou inflamatório ou M1, *tissue remodeling/profibrotic* ou M2 e regulatório (61).

Os macrófagos clássicos inflamatórios ou M1 (ativados pela via clássica), são induzidos por IFN- γ isoladamente ou em conjunto com o LPS microbiano, ou ainda por citocinas como Factor de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) ou GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (62). Os M1 apresentam antigénios, e expressam IL-1R, receptores *toll-like* (TLR) 2, TLR4 e iNOS (*Inducible nitric oxide synthase*), e possuem um fenótipo pró-inflamatório caracterizado pela produção de citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 e ainda quimiocinas CCL2-CCL5, CCL8-CCL11 (62). Estes mediadores podem ser prejudiciais para o hospedeiro, pois promovem também o desenvolvimento e expansão das células Th17 (63), mencionadas a seguir e com um papel importante na resposta imune.

Os Macrófagos *tissue remodeling/profibrotic* ou M2 são inicialmente ativados por exposição à IL-4 ou IL-13 (64), contudo, outros estímulos podem induzir a sua polarização em macrófagos alternadamente ativados, resultando na subdivisão dos M2 em três subtipos: M2a, M2b e M2c (62).

Os M2 estão implicados na resolução da inflamação, pois têm uma capacidade reduzida em produzir citocinas pró-inflamatórias (7). A transição de um fenótipo inflamatório (M1) para um fenótipo reparador (M2) induz a progressão da fase inflamatória para a fase reparadora tecidual (62).

Os macrófagos regulatórios produzem altos níveis de citocina IL-10 (imunossupressiva), e provocam a sub expressão de IL-12 (61). Estes macrófagos são fortes inibidores da inflamação, pois a IL-10 inibe a produção e contraria os efeitos de várias citocinas pró-inflamatórias (63).

3.1.1.4 Células B e Células T

Quando a lesão inflamatória precoce persiste sem resolução, os antígenos bacterianos são processados e apresentados pelos linfócitos, macrófagos e CDs (31). Após apresentarem os antígenos ao sistema imune inato, os linfócitos diferenciam-se em dois subtipos: linfócitos T e linfócitos B (7).

Os linfócitos B transportam imunoglobulinas na superfície, que funcionam como receptores de antígenos. Os anticorpos, que são formas solúveis de imunoglobulina, são secretados após ativação das células B para se ligarem aos agentes patogénicos e material estranho, sendo este fenómeno conhecido como imunidade Humoral (7).

As células T são as células efetoras da imunidade mediada por células, ou hipersensibilidade tardia (7). A ativação dos recetores dos diferentes tipos de células T requer o complexo maior de histocompatibilidade, existindo para isso duas classes de moléculas deste complexo que são necessárias para este processo (7). Vários sub-tipos de células T eliminam células alvo infetadas e ativam macrófagos, células B e outras células T (7).

Na DP, as células T comportam-se como uma espada de dois gumes, pois enquanto protegem o hospedeiro da invasão bacteriana, a libertação excessiva de citocinas resulta em danos para os tecidos, pois estas induzem a inflamação (28). A função das células T numa lesão é determinada pelas citocinas que libertam (28).

As células T dividem-se em sub-tipos com base no tipo de moléculas que são expressas na sua superfície, CD4 ou CD8. As T *helper* (Th) ou Th CD4⁺ regulam a imunidade e a inflamação através da ativação dependente de antígenos, e a sua diferenciação em subtipos funcionalmente distintos está subordinada à produção de citocinas (65). Consoante o tipo de citocinas, as Th dividem-se em Th1, Th2 e Th17 (7).

As células Th1 secretam IL-2, IL-12 e IFN- γ , enquanto que as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (7). Ambas as células Th produzem IL-3, TNF- α e GM-CSF (7). O papel principal da IL-2 e IFN- γ produzidos pelas Th1 é aumentar as respostas mediadas por células, enquanto a IL-4, citocina característica das Th2, suprime este tipo de resposta (7).

Os sub-tipos de células T são também importantes no comportamento das células B, pois direcionam-nas na produção de Imunoglobulinas. As células CD8 T ou células T citotóxicas também são células efetoras que secretam citocinas características quer das Th1 quer das Th2 (7).

As Th17 e as Treg desempenham um papel antagonista como células efetoras e supressoras, respetivamente (7).

As Th17 são uma linhagem única de células Th pro-inflamatórias que foram pela primeira vez identificadas através da produção de IL-17A (mais conhecida como IL-17) (65). As Th17 expressam várias citocinas pró-inflamatórias que incluem IL-1A e IL-17F, IL-26, IL-21, IL-22 e GM-CSF, bem como CCL20 (*chemokine C-Cmotif ligand 20*) (65).

Desde a sua descoberta, sabe-se que as células Th17 estão implicadas na patogénese de muitas doenças auto-imunes, como a psoríase, artrite Reumatóide, doença intestinal inflamatória e esclerose múltipla (65). Mais recentemente, as Th-17 e as citocinas associadas são observadas nas lesões de Periodontite (7), pois são apontadas como células efetoras da inflamação autoimune (65).

As células Treg têm uma função protetora nas lesões dos tecidos periodontais (7), e são encontradas nessas lesões. As Treg são células que expressam CD4- e CD5- que regulam especificamente a ativação, proliferação e função efetoras das células T convencionais ativadas (66,67). As citocinas produzidas pelas Treg são Factor de crescimento beta (TGF- β) e CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4*), que regulam negativamente a inflamação (7). Em conjunto com a IL-10, a TGF- β e CTLA-4 estão associadas à diminuição da progressão da DP (68).

3.1.1.5 Células dendríticas

As CDs são células apresentadoras de antígenos mais potentes, cuja função é iniciar a resposta imune adaptativa (31). Estas células atuam num momento crítico da resposta imune, pois “decidem” que tipo de resposta se vai desenvolver contra o microrganismo (51). Na cavidade oral esta tarefa é altamente complexa uma vez que as superfícies mucosas são continuamente expostas e/ou colonizadas por uma grande diversidade de microrganismos (69). Assim, torna-se difícil distinguir entre micróbios inócuos e prejudiciais, e os mecanismos pelos quais as CDs “decidem” reagir ou tolerar estes microrganismos não são completamente conhecidos (51). Para uma CD considerar um microrganismo invasor como patogénico, deve desencadear sinais inflamatórios diretos e/ou indiretos que instruem outras CDs a induzir a imunidade adaptativa, com potencial de danificar o tecido ósseo (51). Para fazer isso, estes microrganismos devem 1) ser reconhecidos por PRR, 2) subverter a imunidade local e/ou 3) alterar a homeostasia do microbiota oral (51).

Quando as CDs são ativadas (pelo contacto com LPS ou complexos imunes produzidos pelas bactérias, ou por citocinas do hospedeiro), sofrem maturação e expressam moléculas estimulatórias, produzindo também padrões de citocinas distintos, como IFN- γ e IL-17, que determinam a migração seletiva da subpopulação de Th e a subsequente produção das citocinas características (70,71). As CDs têm um papel crítico na iniciação das respostas mediadas pelas células T, e há muito que se suspeita que diferentes populações de CDs possam estar especializadas na indução de diferentes respostas de células T efetoras (30).

As citocinas afetam a diferenciação das CDs e são importantes no controlo de estados de inflamação permanente (como o caso da Periodontite Crónica), quando as CDs são continuamente expostas a antígenos (72).

3.2.O biofilme oral e a disbiose microbiana

A cavidade oral está povoada por uma comunidade microbiana muito diversa que comporta mais de 700 espécies, que vivem numa relação simbiótica entre si e com o sistema imunitário do hospedeiro (27). As interações entre o hospedeiro e o microbioma nas superfícies orais mucosas são críticas para manter a homeostasia dos tecidos periodontais. O equilíbrio entre o *turn-over* das células microbianas, e as respostas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias do hospedeiro determinam o resultado clínico.

A transição da saúde Periodontal para a doença está associada a uma mudança dramática de uma comunidade microbiana simbiótica para uma comunidade disbiótica, onde predominam os anaeróbios assacarolíticos (15,39). Esta transição está associada à resposta de um hospedeiro suscetível que não consegue resolver a inflamação induzida pelos microrganismos. Esta comunidade está enriquecida com fatores de virulência que incluem moléculas sinalizadoras e modificadoras da resposta imune, bem como moléculas capazes de induzir por via direta e indireta a destruição tecidual (15). Esta comunidade está adaptada para sobreviver num ambiente inflamatório e estimula e controla a resposta inflamatória do hospedeiro (73).

O *habitat* predominante das bactérias associadas à DP é o sulco gengival, onde existem microambientes distintos: o biofilme associado ao dente, o FCG e o epitélio do sulco (74). O ambiente subgengival é rico em mediadores inflamatórios e imunes, e fornece condições para a comunidade bacteriana (75) se desenvolver. A saúde Periodontal requer a existência de um estado imuno-inflamatório controlado que mantenha a homeostasia entre hospedeiro/bactéria no periodonto (74). Contudo, na DP, a resposta imune do hospedeiro é desregulada, quer por subversão da comunidade bacteriana ou por defeitos imuno-regulatórios (74). Uma resposta imune mal controlada pode, por seu turno, gerar um ciclo patogénico auto-perpetuante, no qual a disbiose e a inflamação se reforçam mutuamente por *feedback* positivo (15).

3.2.1. *P. gingivalis*: o microrganismo chave na disbiose microbiana

Existe evidência científica de que certas bactérias estão associadas às formas progressivas da DP, como a *P. gingivalis* (7,39). Esta bactéria assacarolítica Gram-negativa é considerada mais como uma manipuladora da resposta do hospedeiro do que uma indutora da inflamação, pois subverte a sinalização imunológica inata, que inclui a interação entre os TLR e o complemento (39). A *P. gingivalis* manipula a resposta do hospedeiro, pois altera indiretamente o crescimento e desenvolvimento da restante comunidade microbiana, desencadeando uma mudança destrutiva na relação simbiótica da comunidade existente com o hospedeiro (39). Assim, esta bactéria causa indiretamente a perda óssea inflamatória, pois a alteração da homeostasia faz com que os restantes comensais tenham o potencial de desregular a inflamação e a doença (39).

A *P. gingivalis* também pode ser detetada em indivíduos periodontalmente saudáveis, em que a doença não progride, o que leva a uma questão: porque é que a presença desta bactéria nem sempre leva à disbiose e, conseqüentemente, à Periodontite (39)? A resposta mais plausível pressupõe que estes indivíduos não são suscetíveis, ou seja, o seu sistema imunológico consegue resistir e tolerar a conversão do microbiota periodontal de simbiótico para disbiótico, devido ao seu próprio estado imuno-inflamatório (39). A regulação deste estado é modificada por vários fatores de risco, endógenos e exógenos: idade, Diabetes Mellitus, uso de tabaco, sangramento à sondagem, envolvimento de furca, história de cirurgia periodontal, profundidade de sondagem (bolsas periodontais), nível de osso radiográfico, restaurações infra-gengivais, cálculo radicular, lesões ósseas verticais (6).

3.3.Reconhecimento Inato dos microrganismos Periodontais

Quando o biofilme se forma na superfície dentária, os microrganismos são imediatamente reconhecidos pelas células da imunidade inata através de padrões moleculares, os PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Estes PAMPs incluem LPS, peptidoglicanos, ácidos lipoteicóicos, e lipoproteínas (53). Estas moléculas são reconhecidas pelos PRR na superfície dos PMNs e macrófagos residentes (53). Um tipo de PRR são os TLR, que quando estimulados por um antígeno bacteriano, induzem uma resposta celular através das vias de Fator nuclear kappa B (NF- κ B) e MAP (*mitogen-activated Protein*), levando as células a secretar proteínas específicas. Estas células ativadas libertam citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimulatórias como TNF- α , IL-1 e IL-8 (53).

Os TLR são os efetores celulares melhor caracterizados para a deteção de microrganismos patogénicos, e reconhecem ligandos que estão presentes na superfície dos mesmos (76). Uma vez ligados, a ativação das vias de sinalização dependentes dos TLR, desempenha um papel importante em direcionar as respostas imunitárias inata e adaptativa do hospedeiro, pois ativa as células apresentadoras de antígenos, a secreção de mediadores inflamatórios, a diferenciação das células T e a produção de anticorpos (77).

Nos humanos estão identificados cerca de 10 tipos diferentes de TLR (76). Na cavidade oral, mais especificamente no epitélio gengival, a expressão e função dos TLR é muito importante na manutenção da homeostasia dos tecidos orais devido à presença constante dos microrganismos comensais (76). Em condições de infeção patogénica, a inflamação gengival dependente dos TLR causa um influxo de neutrófilos, monócitos e linfócitos para facilitar a eliminação bacteriana (78). Nas células epiteliais orais (incluindo a língua) foram detetados desde o TLR1 ao TLR9, embora esta expressão possa ser variável e induzível. A expressão dos TLR 2, 3, 4, 5, e 9 parece só acontecer se o tecido está inflamado (79). A expressão de TLR7 e TLR8 é idêntica tanto

em tecidos saudáveis como inflamados (77). A inflamação gengival aguda e persistente aumenta a expressão de TLR2 e TLR4, favorecendo a resposta imunitária inata local (80). Numa resposta inflamatória crónica, como a Periodontite, a expressão de TLR4 no epitélio gengival diminui, como uma tentativa de diminuir as respostas inflamatórias que podem agravar a destruição no osso e no tecido oral (81).

O mecanismo de defesa mais relevante que é sinalizado provavelmente pelos TLR na cavidade oral é a indução das defensinas, substâncias antimicrobianas (tipo α , β , e θ) (77). As defensinas- β induzem a sinalização dos TLR e a ativação das células dendríticas imaturas, monócitos e células T de memória no epitélio oral (82).

Em suma, existe uma grande variedade de TLRs, e dependendo do tipo de epitélios, a sua expressão é diferente, pois ao serem ativados por motivos microbianos diferentes respondem a diferentes bactérias.

3.4. Progressão da lesão inflamatória nos tecidos Gengivais/Periodontais

Numa fase aguda da inflamação, a resposta é rápida e de curta duração. Se o agente agressor não for removido, a resposta torna-se crónica, considerando-se como não-fisiológica ou patológica. Assim, um processo que se considera de defesa, pode paradoxalmente contribuir para os danos tecidulares observados na Gengivite e Periodontite (21). Quando a inflamação se torna crónica, a resposta do sistema imune adaptativo é ativada, com envolvimento dos mecanismos celulares e não-celulares da imunidade adquirida (7).

Page e Schröder (83) dividiram, em 1976, a progressão das lesões gengivais/periodontais em quatro estágios com base em dados histopatológicos (2,17): lesão inicial, lesão precoce, lesão estabelecida e

lesão avançada. A lesão avançada é considerada um estágio destrutivo, pois representa a transição da Gengivite para Periodontite (7). A progressão da DP é um processo interativo e dinâmico, havendo por vezes sobreposições entre estágios (27).

A lesão inicial é a resposta aguda dos leucócitos residentes e das células endoteliais ao biofilme bacteriano (7), e aparece cerca de 2-4 dias após acumulação de placa numa gengiva previamente saudável (16). Neste estágio, não há sinais de inflamação clínica, e as mudanças nos tecidos só são observadas histopatologicamente. Aumenta também a migração de PMNs até à lesão devido a estímulos quimiotáticos que se originam tanto das células bacterianas como dos mediadores inflamatórios do hospedeiro (27). Os produtos metabólicos bacterianos desencadeiam a produção de citocinas pelas células do epitélio juncional, e a produção de neuropéptidos causa vasodilatação dos vasos sanguíneos locais (7). A intensidade e as características da resposta inflamatória determinam se a lesão inicial resolve rapidamente ou se evolui para lesão crónica (27).

Após vários dias de acumulação de placa bacteriana, a lesão torna-se precoce, com o aumento do número de vasos sanguíneos no plexo dento-gengival (16). As células predominantes neste estágio de Gengivite são os PMNs e os linfócitos, predominantemente as células T (16,27). Há um elevado número de neutrófilos no tecido conjuntivo e começam a aparecer no local da inflamação os macrófagos, células plasmáticas e mastócitos (7,27). Estas células produzem mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17 e TNF- α , que podem exacerbar a resposta inflamatória e promover a progressão da doença para um nível mais avançado (27). As proteínas do complemento são continuamente ativadas, e o epitélio prolifera, observando-se clinicamente sinais de inflamação gengival (sangramento) (7,27). O fluido crevicular gengival aumenta neste estágio. A lesão precoce pode persistir por longos períodos de tempo antes de progredir para a lesão estabelecida, dependendo maioritariamente da suscetibilidade do hospedeiro e da virulência bacteriana (16).

O estágio seguinte é a lesão estabelecida, que pode ser considerada como o período de transição entre a resposta imune inata e resposta imune adquirida (7) e paralelamente, a transição de um estado agudo para um estado crônico (27). As manifestações celulares dos estágios inicial e precoce ainda persistem, e aparecem os linfócitos B (27). Os níveis de macrófagos, PMNs, monócitos e células T continuam a aumentar. Nesta fase, o fluxo sanguíneo está comprometido e a aumenta a atividade colagenolítica, e também a produção de colagénio pelos fibroblastos, mas sem perda óssea. Em indivíduos jovens, os leucócitos predominantes são os linfócitos, enquanto que em indivíduos mais velhos, as células dominantes são as plasmáticas (84). Clinicamente, observa-se uma Gengivite Moderada a Severa, com sangramento gengival e mudanças no contorno e cor gengivais (7). A degradação do colagénio continua a ocorrer, enquanto o infiltrado inflamatório se expande mais profundamente nos tecidos.

O último estágio, a lesão avançada, é a transição da Gengivite para a Periodontite (7). O infiltrado inflamatório é predominantemente composto por células plasmáticas, que se estende em profundidade no tecido conjuntivo. Observam-se, clínica e histopatologicamente, perda de inserção irreversível (7), e existe extensa degradação das fibras de colagénio e mais migração apical do epitélio juncional (16). A bolsa periodontal aumenta e o biofilme continua a crescer apicalmente em ambiente anaeróbio. A produção de mediadores inflamatórios como as citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e proteínas do complemento pelos PMN ativados, macrófagos, monócitos, linfócitos, fibroblastos e outras células hospedeiras podem causar danos oxidativos ao promover a libertação das MMP (7). Posteriormente, as citoquinas podem aumentar a expressão de RANKL, enquanto diminuem a produção de Osteoprotegerina (OPG). Se a inflamação não resolver, ocorre a destruição da matriz extra-celular e perda irreversível de osso alveolar (27).

3.5. A gengivite como inflamação aguda

A inflamação na Gengivite é uma reação de fase aguda do organismo causada por um distúrbio na homeostasia, provocado pelo biofilme oral(85).

O estágio inflamatório observado na Gengivite é desencadeado pelos componentes bacterianos mencionados anteriormente, resultando na libertação de PAMPs ou DAMPs (*pathogen molecular patterns* e *damage-associated molecular patterns*) que se ligam e activam recetores de reconhecimento como os TLR ou outros receptores nas células residentes (34,86–88).

A ativação destes receptores estimula a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que induzem a inflamação e o recrutamento de células inflamatórias, nomeadamente monócitos e neutrófilos (89). Os monócitos recrutados são pró-inflamatórios e irão consequentemente diferenciar-se em macrófagos inflamatórios M1 (Figura 2) (62).

Para além dos macrófagos, a resposta do hospedeiro ao desafio bacteriano também inclui a ação e estimulação de outras células inflamatórias e células residentes nos tecidos, como ilustrado na Figura 3. Através de uma cascata de eventos, os mastócitos são estimulados a libertar aminas vasoativas e TNF- α pré-formado, que aumenta a permeabilidade vascular e a expressão de moléculas de adesão (34). Este processo recruta PMNs no tecido, onde libertam enzimas lisossomais, que contribuem para a degradação tecidular (17).

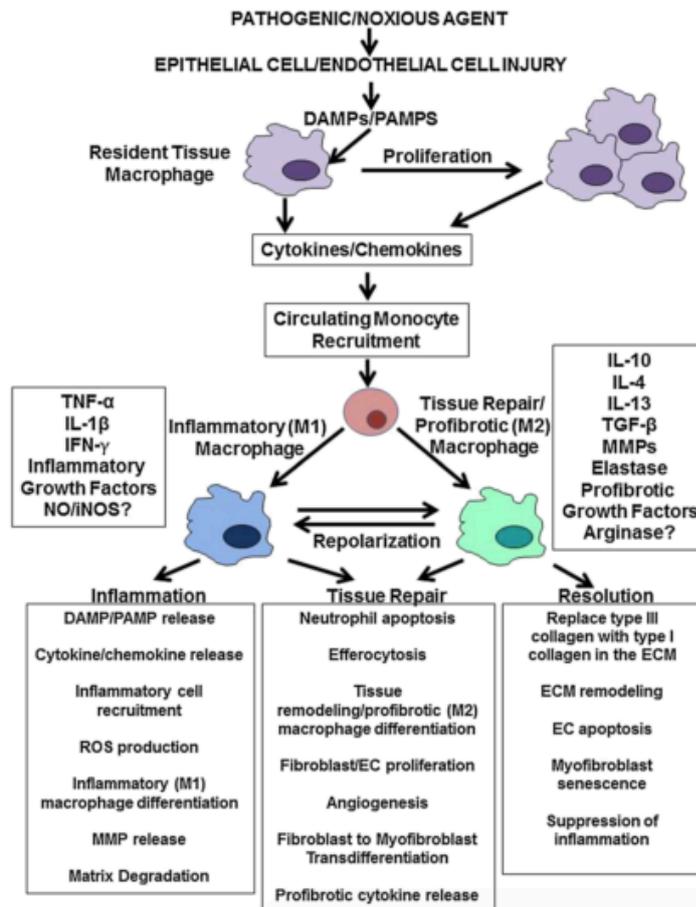


Figura 2 – Recrutamento dos Monócitos e Polarização dos Macrófagos. A liberação de PAMPs/DAMPs pelos tecidos infectados desencadeia uma resposta inflamatória que ativa os macrófagos residentes, estimulando a sua proliferação e iniciando o recrutamento de monócitos inflamatórios e neutrófilos ao local. As citocinas e quimiocinas produzidas pelas células epiteliais locais, endoteliais e imunes influenciam posteriormente a diferenciação e polarização dos monócitos recrutados em macrófagos M1 e/ou M2. (EC, Endothelial cell; ECM, Extracellular matrix; iNOS, Inducible nitric oxide synthase). Adaptado de Wermuth *et al* (62).

Como resposta, os linfócitos e macrófagos invadem posteriormente os tecidos. Neste estágio, cerca de 60-70% do colagénio no tecido conjuntivo é degradado no local da lesão, contudo o osso ainda está intacto (17). Nesta fase ainda é possível a reparação e remodelação dos tecidos gengivais sem danos permanentes (34). Contudo, a susceptibilidade inata de alguns hospedeiros e/ou os factores ambientais não permite a resolução da inflamação, com consequente destruição de tecido conjuntivo e perda irreversível de osso (17,90). Neste caso, os macrófagos formam pré-osteoclastos, que após maturarem em osteoclastos estão aptos a degradar o osso alveolar (91).

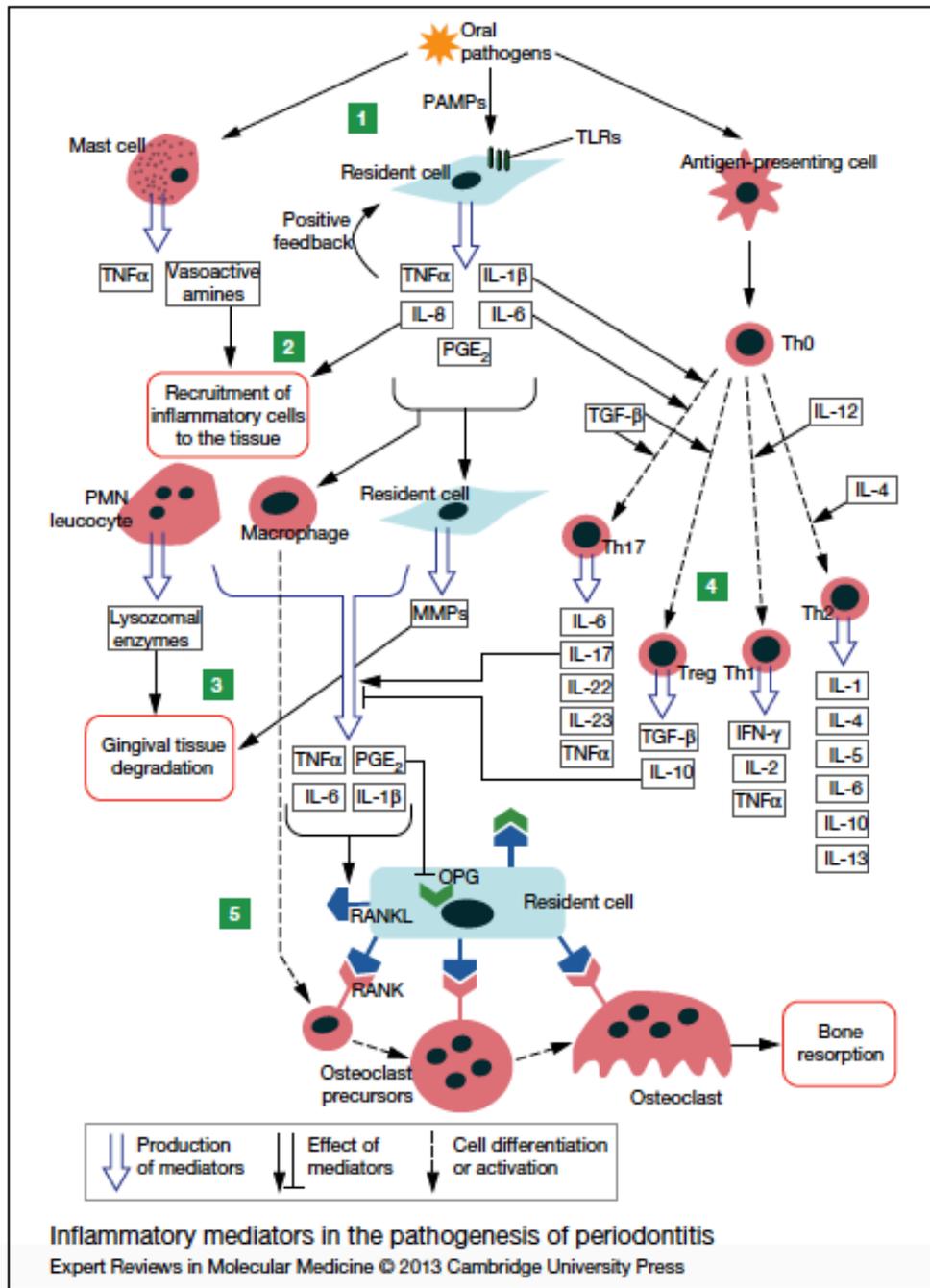


Figura 3 – Mediadores inflamatórios na Patogénese da Periodontite. 1) na imunidade inata, componentes das bactérias presentes no biofilme oral, como o LPS, estimulam os mastócitos a libertar aminas vasoactivas e TNF- α , e causam a libertação de mediadores inflamatórios nas células residentes do tecido gengival. 2) Com a ação destes mediadores libertados, as células inflamatórias são recrutadas nos tecidos. 3) PMNs libertam enzimas lisossomais, e as MMP aumentam. As MMP e as enzimas lisossomais contribuem para a degradação do tecido gengival. 4) linfócitos e macrófagos invadem o tecido. As células apresentadoras de antígenos ativam as células Th0. As citocinas produzidas por células T podem aumentar ou inibir a produção de mediadores inflamatórios. 5) Citocinas e Prostaglandina E₂ (PGE₂) afectam a expressão de RANKL e OPG, resultando na formação e ativação dos osteoclastos capazes de degradar o osso. Traduzido e adaptado de Yucel-Lindberg *et al* (34).

Sem resolução ativa da inflamação, os antígenos bacterianos encontram eventualmente células apresentadoras de antígenos (34), o que estimula as respostas mediadas pelas células T mencionadas anteriormente.

4. A SALIVA

4.1. Composição, função e características

A saliva é um fluido claro, ligeiramente ácido (pH entre 6 e 7), que é secretada para a boca e provém das glândulas salivares major e minor (92). Em circunstâncias normais, um adulto produz cerca de 500 a 1500mL de saliva por dia (93).

A saliva é o biofluido oral que contribui para muitas funções, como a fala, a degustação, deglutição, digestão oral, lubrificação dos tecidos, proteção anti-viral e anti-bacteriana, manutenção da integridade dentária, homeostasia e saúde oral e geral (94).

Cerca de 99% do conteúdo salivar é água, sendo que o restante 1% representa os componentes orgânicos e inorgânicos (95). Os componentes inorgânicos incluem electrólitos como o sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloro e fosfato, enquanto os componentes orgânicos podem ser proteicos ou não proteicos (96). Os componentes não proteicos são o ácido úrico, bilirrubina, creatinina, glucose, lípidos (colesterol e ácidos gordos), aminoácidos, entre outros (94). As proteínas presentes na saliva incluem proteínas ricas em prolina, amílase, mucinas, lisozimas, IgA, lactoferrina, peroxidase, estaterinas, histatinas, metaloproteases da matriz, glicoproteínas e lipoproteínas, entre outras (94). Outros componentes proteicos incluem enzimas e inibidores enzimáticos, citocinas e hormonas (94).

A colheita salivar tem muitas vantagens relativamente à colheita de sangue, no que toca ao método de recolha (pouco invasivo), reduzindo a ansiedade do paciente, e também os custos associados ao processamento e armazenamento das amostras, bem como o baixo risco de contaminação (94). Outra vantagem é o facto de a saliva providenciar dados clínicos relevantes e informação celular relativa a compostos biologicamente ativos,

que podem ser usados para avaliar e monitorizar o processo saúde-doença (97).

4.2. Diagnóstico salivar e implicação na Doença Periodontal

A saliva é cada vez mais considerada como um teste de diagnóstico fiável uma vez que a sua colheita é não invasiva e a disponibilidade é imediata (94,98). Muitos estudos mostram que, para além da DP, existem outras doenças que podem ser detetadas na saliva através de biomarcadores salivares, como é o caso da cárie, cancro oral, e ainda doenças sistémicas como a hepatite, síndrome de Sjögren, cancro da mama, entre outros (98).

Uma vez que a saliva está em constante contacto com o periodonto, considera-se um fluido de diagnóstico vantajoso para a DP, porque os marcadores refletem a atividade corrente da doença, permitindo ao Médico Dentista determinar a sua severidade e adaptar as opções de tratamento (12).

A saliva pode ser colhida e analisada como mista (*whole saliva*) ou como saliva de glândulas específicas, sendo que neste último caso, há produção de maior quantidade de certos constituintes salivares. É o exemplo do FCG, que é muito útil para análise de proteínas (94). A *whole saliva* contém uma mistura de fluidos que provêm das glândulas salivares major e minor, FCG, soro, células epiteliais e muitos micróbios (99). A recolha da *whole saliva* é preferível para a avaliação de doenças sistémicas (94).

A *whole saliva* pode ser obtida por colheita estimulada (estimulação mastigatória ou gustatória) ou não estimulada (depende do nível de hidratação do indivíduo e não existe estímulo mecânico, mastigatório ou gustatório) (98). Apesar de a saliva estimulada aumentar o volume da recolha, há uma diminuição no pH e na concentração de certos constituintes (96).

4.3. Biomarcadores salivares propostos para a gengivite

Como referido anteriormente, o diagnóstico da DP é realizado através da medição de parâmetros observacionais que não dizem respeito à doença atual e à sua progressão (18,19). Assim, é necessário o recurso a novos meios de diagnóstico que possam detetar a atividade da doença, prever a sua progressão e avaliar a resposta à terapia periodontal (19).

Os biomarcadores salivares tem vindo a adquirir grande potencial como indicadores de saúde oral e sistémica, e portanto, também como meio de diagnóstico da DP (12).

Por definição, um biomarcador é um indicador objetivo dos processos biológicos e patogénicos e das respostas farmacológicas da intervenção terapêutica (100), além de fornecer informação relativamente ao estado fisiológico de um organismo vivo (101). A compreensão e avaliação da significância de um biomarcador pode ser útil em determinar a presença, diagnóstico, localização, progressão, prognóstico e atividade de uma doença (102).

O biomarcador deve ser simples de analisar, e a leitura deve ser facilmente interpretável; deve dar informação sobre a atividade e a progressão da doença, e no caso deste estudo, a progressão de Gengivite para Periodontite (3).

Ao longo da última década foram realizados estudos experimentais que associaram a Gengivite à presença de biomarcadores salivares específicos (41), contudo nenhum deles foi ainda capaz de os associar exclusivamente à doença (Tabela 2).

Tabela 2 – Identificação de Biomarcadores salivares associados à Gengivite em alguns estudos realizados desde 2008.

Biomarcador	Método de recolha	Doença Associada	Técnica Usada	Referência
Cystatin C, IL-1b e TNF- α	Saliva e FCG	Gengivite	Immunoassay e ELISA	(103)
IL-1ra, IL-6	Saliva	Gengivite Experimental	Multiplex <i>immunoassay</i>	(104)
Neutrophil defensin-3 (DEFA3)	FCG	Gengivite Experimental	Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry	(105)
PGE ₂ , MIP-1 α	Saliva não estimulada	Gengivite	Multiplex <i>immunoassay</i>	(106)
CCL28, IL-8, IL-1 β , TNF- α	FCG	Gengivite	ELISA	(107)
MMP-3, -8 e -9	Sangue e FCG	Gengivite + Síndrome de Down	Flow cytometry	(108)

Rosa *et al* (41) propõe a existência de alguns biomarcadores com quantificação, mas sem exclusividade para a Gengivite: oncostatina-M e azurocidina (também presentes na Periodontite Crónica); RANKL, que é partilhada por todas as variantes da DP, sendo os valores mais baixos observados na Gengivite; plastina-2 e serotransferrina, propostos como biomarcadores para a Gengivite mas sem quantificação (41). O autor propõe ainda outra molécula que pode ser usada para o diagnóstico diferencial entre Gengivite e Periodontite crónica, ainda sem dados de regulação: defensina 3 (DEFA3) (41).

5. PROBLEMA EM ESTUDO

Neste estudo experimental pretende-se verificar *in vivo* a quantificação das quimiocinas CCL3 e CCL13 na saliva de indivíduos com Gengivite e indivíduos saudáveis. Apesar destes marcadores não terem sido propostos para a Gengivite, dada a sua importância na identificação da Periodontite crónica foram avaliados neste estudo como marcadores de diferenciação entre gengivite e periodontite crónica. De forma mais detalhada, os objetivos deste estudo são averiguar se estes marcadores:

- 1) identificam a presença de inflamação periodontal;
- 2) determinam a extensão da inflamação;
- 3) avaliam o potencial de progressão da doença;
- 4) permitem o diagnóstico diferencial da DP.

6. METODOLOGIA

6.1. Estabelecimento dos grupos de Estudo

O presente estudo foi conduzido em conjunto com o SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva), do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa (UCP) do Centro Regional das Beiras, e foi aprovado pelo Diretor da Clínica Universitária da UCP.

Os participantes do estudo são utentes da Clínica Universitária da UCP, alunos do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da UCP e alunos da Escola Secundária Alves Martins de Viseu, aos quais foi fornecido um consentimento livre e informado do Biobanco do Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa (Anexo 1). Tanto as equipas médicas como as Entidades referidas anteriormente foram sensibilizadas e informadas acerca dos objetivos e da metodologia do estudo.

Como meio de recolha de dados foi elaborado um questionário (Apêndice 1) acerca do estilo e qualidade de vida (alimentação, sono, escala de felicidade), história médica (medicação, patologias e história médica familiar) e registo do exame oral (índice de Placa Sillness e Loe, Índice CPO, *Periodontal Screening Record* e *Bleeding on Probing* para diagnóstico Periodontal) do participante. Com este questionário pretendeu-se fazer a caracterização mais detalhada do participante e o diagnóstico Periodontal para atribuição ao grupo de estudo.

A colheita de dados consistiu em 3 fases: 1) entrega e preenchimento do consentimento informado; 2) recolha da amostra de saliva; 3) diagnóstico Periodontal e preenchimento do questionário do dador.

O consentimento livre e informado (Anexo 1) foi assinado, individualmente, pelos participantes no estudo, sendo fornecidas informações acerca dos objetivos, procedimentos, benefícios e riscos da colheita, bem como acerca da identificação, confidencialidade e tempo de conservação das amostras.

As recolhas de saliva tiveram lugar na Clínica Universitária da UCP, e foram efetuadas entre Dezembro de 2014 e Abril de 2015.

6.2. Exame Oral e Diagnóstico Periodontal

Todos os participantes foram avaliados clinicamente por um examinador calibrado. O exame oral foi realizado e registado através do Índice CPO (109), Índice de Placa Sillness e Loe (110) para avaliar o índice de Higiene Oral, onde foi registada a quantidade de placa bacteriana visível respectiva às quatro superfícies dentárias de cada dente (vestibular, mesial, lingual e distal), sem corante.

A condição Periodontal foi diagnosticada através: 1) da profundidade de Sondagem ou *periodontal depth* (PD) em 6 sítios por dente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular; disto-lingual/palatino, lingual/palatino, mesio-lingual/palatino), em todos os dentes; 2) sangramento à sondagem ou *bleeding on probing* (BOP); 3) perda clínica de inserção ou *clinical attachment loss* (CAL), definida como a distância a partir da margem gengival até à base do sulco/bolsa periodontal (104).

Realizados os diagnósticos, os participantes foram classificados em dois grupos: saúde periodontal e sistémica ou grupo de controlo (S), se $PD < 3\text{mm}$, $BOP < 10\%$ e $CAL = 0\text{mm}$; gengivite e saúde sistémica ou grupo de estudo (G), se $PD \leq 3\text{mm}$, $BOP \geq 10\%$, e $CAL = 0\text{mm}$ (104).

Os critérios de inclusão para os grupos são: idade ≥ 16 e ≤ 30 anos, presença de pelo menos 15 dentes; sem hábitos de alcoolismo; sem disfunção hepática, renal ou salivar, não ser portador de doença intestinal inflamatória, doenças granulomatosas e Diabetes; não ter sido submetido a transplante de órgãos ou terapia contra cancro; não possuir abscesso periodontal ou Periodontite Agressiva; no caso de ser mulher, não estar grávida ou lactente; não apresentar sintomas de doença aguda (febre, dor de garganta e diarreia),

não ser portador de próteses removíveis ou aparelhos ortodônticos, não apresentar qualquer condição inflamatória na mucosa oral (aftas, líquen plano, leucoplasia e cancro oral) (106); não ter tomado antibióticos e/ou anti-inflamatórios nos últimos 3 meses (111) imunossupressores no mês anterior (106), nem antagonistas do cálcio e anti-convulsionantes (111).

6.3. Calibração dos Examinadores

Estabelecer a fiabilidade de um examinador é uma componente vital de uma investigação clínica, especialmente no âmbito da Periodontologia (112). A não calibração de um examinador na colheita das medições periodontais resulta em dados pouco precisos e não confiáveis, comprometendo a veracidade dos dados obtidos posteriormente (112). A Literatura de pesquisa em saúde oral relata uma variedade de índices de concordância intra e inter-examinadores, para avaliar a confiabilidade e reprodutibilidade de medidas periodontais (112), e por essa razão optou-se por se realizar esta calibração.

A calibração dos Examinadores para este estudo foi adaptada do artigo “*Study Design for Calibration of Clinical Examiners Measuring Periodontal Parameters*” de Hill *et al* (112).

Foram recrutados 10 pacientes piloto, funcionários da Clínica Universitária da UCP. A todos foi fornecido um consentimento informado para participação no estudo. Foram considerados elegíveis os pacientes piloto que se adequavam aos critérios de inclusão: 1) possuir no mínimo 20 dentes, 2) possuir no mínimo um molar por quadrante, e 3) serem portadores de DP Crónica (112).

A sequência de examinação foi a que se segue. O examinador *Standard* (o Docente da Disciplina de Periodontologia) mediu o valor de PD e recessões gengivais em 6 superfícies por dente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular; disto-lingual/palatino, lingual/palatino, mesio-lingual/palatino), em todos os dentes de todos os pacientes piloto, excepto terceiros molares e implantes. Foi utilizada uma sonda Periodontal milimetrada OMS, e

considerou-se o valor de PD como a distância da margem gengival livre até à base da bolsa periodontal.

Posteriormente, os examinadores A e B efetuaram o mesmo procedimento aos pacientes piloto, por ordem aleatória. Foi medido apenas um quadrante por paciente, e os examinadores A e B nunca mediram o mesmo quadrante relativo ao mesmo paciente. Como se sabe que o valor de PD aumenta com medições repetitivas (113), a sequência dos examinadores A e B foi alternada (ex: Examinador A seguido do Examinador B *versus* Examinador B seguido do Examinador A).

6.4. Colheita das amostras de Saliva

A recolha das amostras de saliva foi realizada na Clínica Universitária da UCP. O procedimento foi sempre realizado de manhã, tendo os dados tomados o pequeno-almoço ou realizado a higiene oral pelo menos uma hora antes da recolha. O material utilizado foi o seguinte: rolos de algodão esterilizados; pinça estéril; tubo Falcon de 15 mL, estéril e devidamente etiquetado, contendo 1 ponta de micropipeta de 1000 µL; e arca frigorífica, para acondicionamento das amostras.

A *whole saliva* dos pacientes, não estimulada, foi recolhida segundo o protocolo do SalivaTec (Anexo 2). Os pacientes tiveram que bochechar vigorosamente com água durante 30 segundos e, depois de a cuspir, esperar 1 minuto sem engolir. Após se colocar 2 rolos de algodão estéreis nas glândulas sublinguais do dador (recolha sublingual), esperou-se 2 minutos, ao fim dos quais se retiraram os respetivos rolos com uma pinça estéril, colocando-os num tubo de 15 mL sobre a ponta da micropipeta.

Foi atribuído a cada amostra, à medida que iam sendo colhidas, um número de série, gerado através da aplicação Quartzzy (sistema para gestão laboratorial online).

No total, foram recolhidas cerca de 48 amostras durante Dezembro de 2014 e Abril de 2015.

6.5. Processamento e armazenamento das amostras

O armazenamento e processamento das amostras foram realizados de acordo com o protocolo de controlo de qualidade de amostras estabelecido no SalivaTec.

Para iniciar o processamento das amostras, procedeu-se à centrifugação das amostras a 10.000 RCFs, durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente retirou-se com uma pinça esterilizada os rolos de algodão dos tubos e também a ponta de micropipeta. Procedeu-se à anotação de alguns dados das amostras relativos ao volume total (usando uma micropipeta), à concentração de proteína (através do NanoVue™) e ao pH. Estes dados foram registados numa tabela numa folha de Excel (Figura 4).

	A	C	D	E	F	G
1	Código Quartzzy	Horas	Tempo de Recolha	Volume Total µL	[Proteína] µg/mL	pH
2	D00004	12h	2 min	1050	1534	7,7
3	D00005	12h	2 min	1050	2020	7,77
4	D00029	10h30m	3 min	1050	2535	7,26
5	D00031	12h	3 min	1050	1422	7,20
6	D00049	11h	3 min	1276	2915	7,95
7	D00051	11h	3 min	1400	3172	7,93
8	D00053	11h	3 min	1400	2373	7,76
9	D00054	11h	3 min	1400	2896	7,54
10	D00056	11h	3 min	1400	2672	7,75
11	D00060	11h	3 min	1040	3044	7,16
12	D00086	10h	3 min	1400	1792	7,71
13	D00101	10h	3 min	1670	2383	7,89
14	D00104	11h	3 min	2800	3463	7,66
15	D00107	12h	3 min	1860	1732	8,24
16	D00119	10h	3 min	500	3866	6,96
17	D00120	10h	3 min	4900	2724	7,95
18	D00131	10h	3 min	1000	4660	7,62
19	D00133	10h	3 min	450	1857	6,46
20	D00134	10h	3 min	2710	3819	7,41
21	D00141	10h	3 min	250	2980	7,1
22	D00148	11h30m	3 min	1217	1359	7,54
23						
24						

Figura 4 – Folha de Excel com dados relativos às amostras de saliva. O “código Quartzzy” corresponde ao número de série gerado automaticamente com a introdução das amostras de saliva na plataforma online; as “Horas” corresponde à hora a que foi realizada a colheita de saliva; o “Tempo de Recolha” corresponde à duração da coleção da *whole saliva* (desde o momento que os rolhões são introduzidos na boca até que são retirados); os dados “volume total”, “[Proteína]” e “pH” foram anotados posteriormente durante o processamento laboratorial das amostras.

Realizou-se a homogeneização da amostra de saliva (usando um vortex) e a alíquotagem das amostras com mais de 300 µL de volume, em alíquotas de 500 µL, que foram colocadas em tubos de crio-conservação. Após este processo as amostras foram armazenadas numa arca congeladora a -80°C para posterior análise.

6.6. Controlo de qualidade das Amostras

O controlo de qualidade das amostras de saliva foi feito apenas para as amostras em que foi obtido em volume total superior a 500 µL.

Das amostras com volume suficiente foram escolhidas as que tinham uma caracterização clínica mais completa (maior volume de dados obtidos do questionário do dador). Para essas amostras foi determinado o perfil proteico por electroforese capilar com recurso ao *Experion™ Automated Electrophoresis Station* (BioRad). As amostras que apresentavam no perfil proteico evidências de degradação foram excluídas do estudo, não sendo avaliadas na tecnologia Multiplex.

O perfil obtido foi utilizado para calcular as concentrações das proteínas identificadas nas diferentes amostras, por comparação com padrões internos como exemplificado na Figura 5.

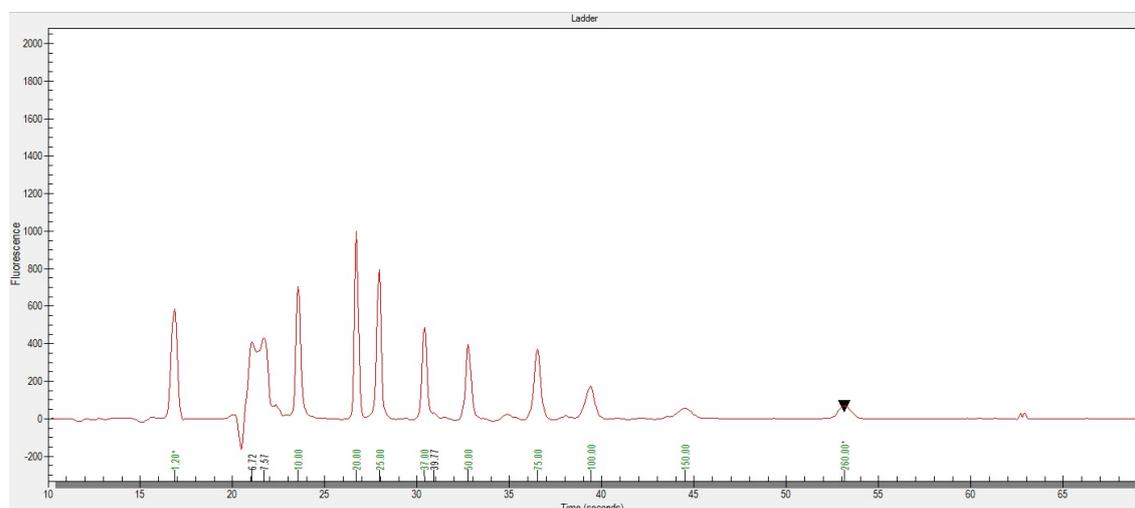


Figura 5 – Eletroferograma tipo (*Ladder*) obtido com o sistema *Experion™ Automated Electrophoresis Station* associando o tempo de migração à fluorescência.

6.7. Análise da Presença e Quantificação de Biomarcadores

A CCL3 e a CCL13, proteínas sugeridas como estando presentes no processo inflamatório, foram avaliadas através da tecnologia Multiplex (*Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex Reader*), segundo instruções do fabricante, nas amostras previamente selecionadas. Foram utilizados os kits Bio-Plex Pro™ Human Chemokine MIP-1 α /CCL3 Set #171-BK44MR2 e o Bio-Plex Pro™ Human Chemokine MCP-4/CCL13 Set #171-BK39MR2.

6.8. Análise Estatística

A informação demográfica e clínica relativa a cada amostra foi inserida numa base de dados, construída com o Microsoft® Excel® para Mac 2011 (Versão 14.4.9). O mesmo *software* foi usado para organizar e calcular a estatística descritiva dos resultados.

Através da utilização do *software* GraphPad Prism, foram comparados os valores obtidos para a CCL3 e para a CCL13 no Multiplex (*Concentration in Range* para o Grupo G e *Observed Concentration* para o Grupo S) através do teste Mann-Whitney não-paramétrico e teste de comparações múltiplas Kruskal-Wallis (*Concentration in Range* para o Grupo G e *Observed Concentration* para o Grupo S), uma vez que os resultados não apresentavam uma distribuição normal.

6.9. Fluxograma

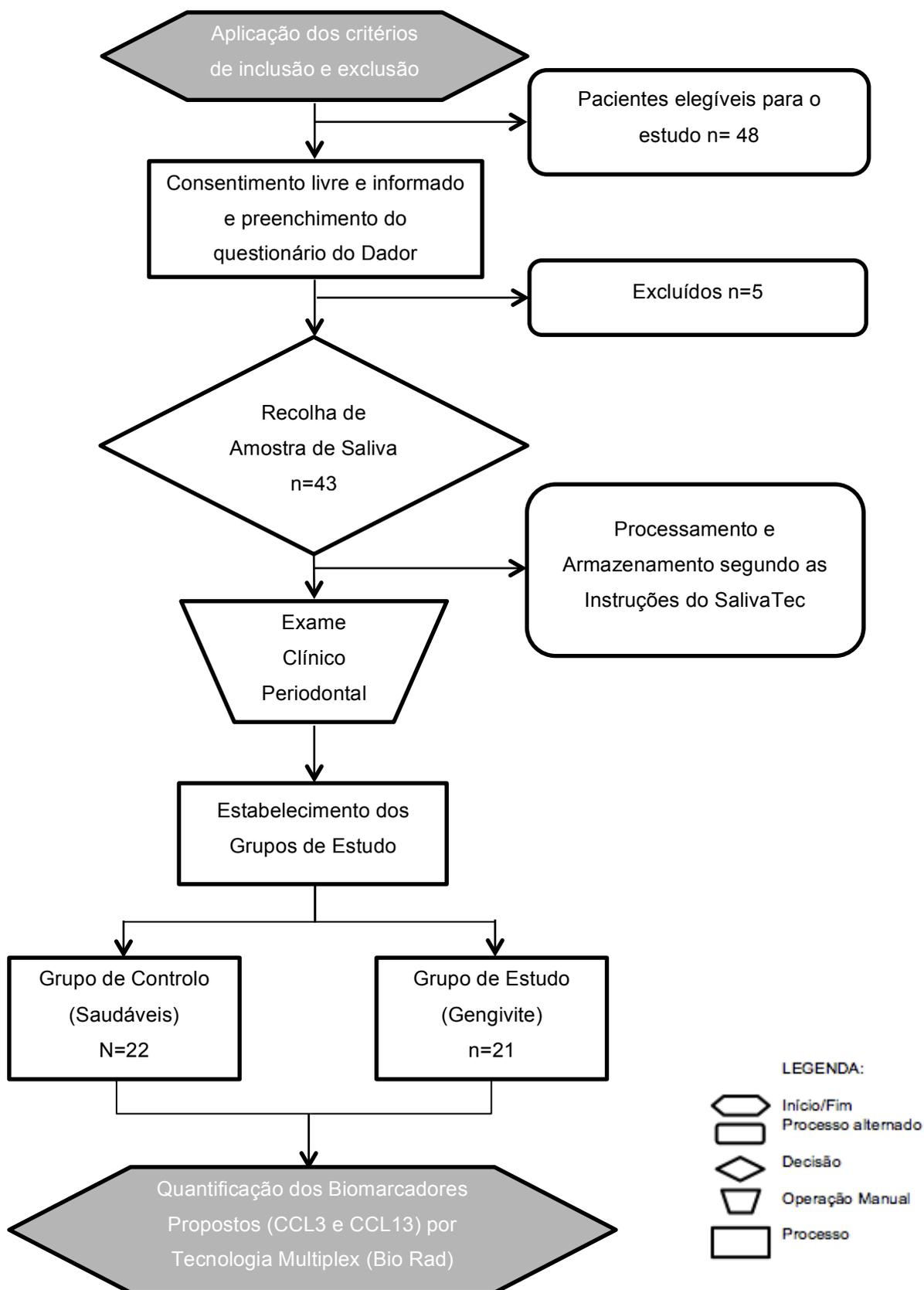


Figura 6 – Fluxograma dos Materiais e Métodos.

7. RESULTADOS

7.1. Parâmetros Demográficos e clínicos

No total foram avaliados clinicamente 43 indivíduos. 21 tinham Gengivite e 22 eram saudáveis de acordo com os critérios de diagnóstico estabelecidos na metodologia. Foram excluídos do estudo 5 indivíduos: 3 usavam aparelho ortodôntico (106); 2 tinham tomado antibiótico há menos de 3 meses (111). As características demográficas estão sumariadas na tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros demográficos e clínicos (média \pm desvio padrão) da População em Estudo (n=33).

Categoria	Gengivite (G) n=21	Saudáveis (S) n=22	G vs S (Teste Mann-Whitney)
Homens	5	2	
Mulheres	16	20	
Idade (anos)	20,10 \pm 4,011	21,00 \pm 3,309	0,1412
IP (%)	30,28 \pm 23,09	19,29 \pm 15,81	0,0635
BOP (%)	15,02 \pm 4,880	6,870 \pm 2,482	< 0,0001

Tanto a idade como o IP não apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$), contudo o valor de P para o BOP nos grupos de Gengivite e Saudáveis é estatisticamente significativo ($p<0,05$).

A Figura 7 (A, B e C) representa a variabilidade dos parâmetros clínicos “Volume Total”, “Concentração de Proteína” e “pH”, respectivamente, para os grupos de estudo S e G. As tabelas mostram que os valores de p obtidos através do teste Mann-Whitney *un-paired* não são significativos ($p>0,05$), ou seja, não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos S e G quanto à variação do volume total, concentração de proteína e pH.

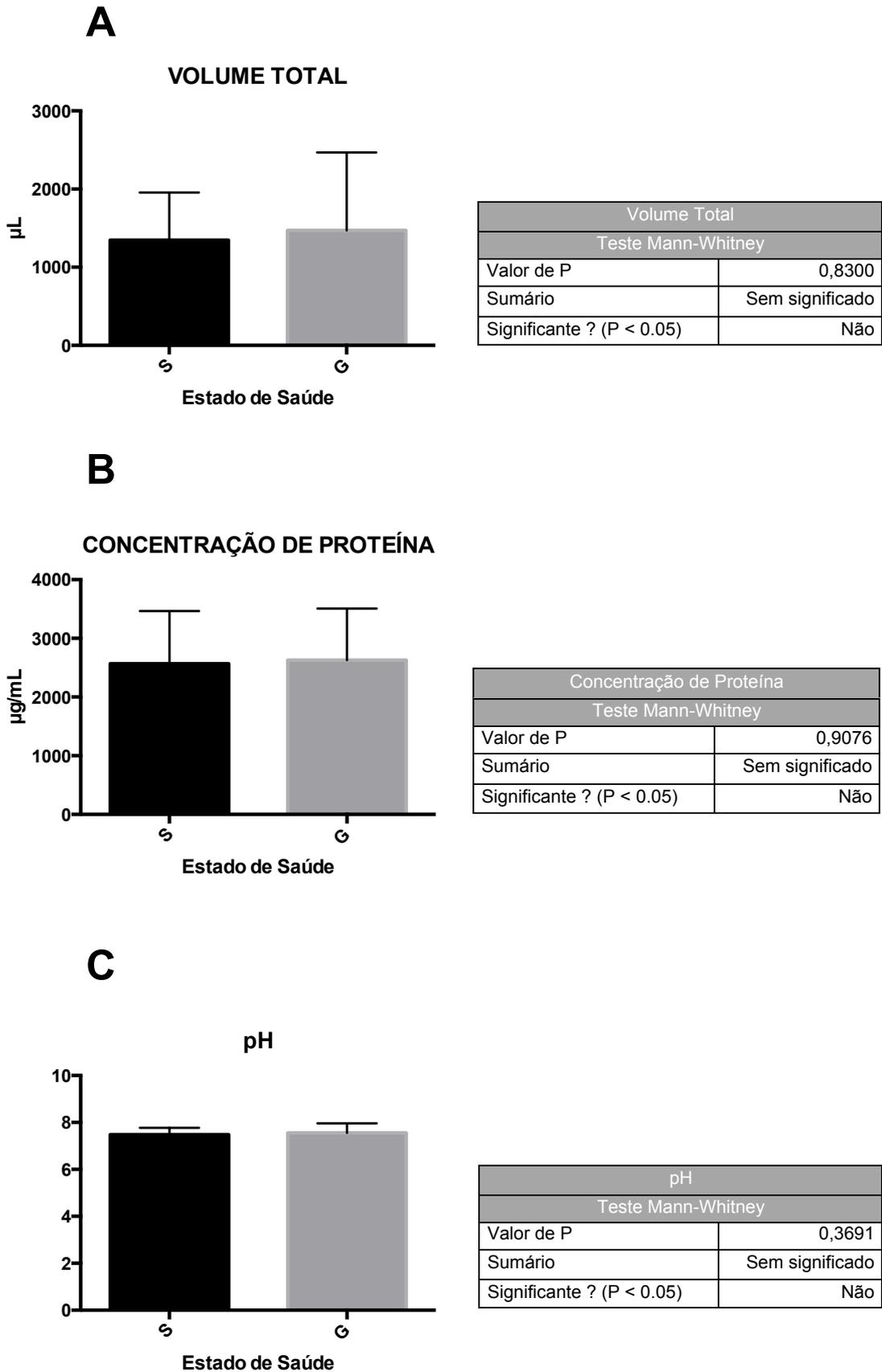


Figura 7 – A) Volume Total e dados estatísticos. B) Concentração de Proteína e dados estatísticos. C) pH e dados estatísticos.

7.2. Perfil Proteico dos grupos de Estudo

A Figura 8 mostra o Eletroferograma obtido através do programa *Experion™ Automated Electrophoresis Station*, em que se observa o traçado da fluorescência em função do tempo de migração das proteínas de 3 amostras, uma de cada grupo de estudo (Saudáveis, Gengivite). Foi adicionado o perfil de mais um grupo de estudo (Periodontite) do trabalho de Hortênsio *et al* (114). Foi escolhida uma amostra de cada grupo consoante o maior número de picos observado e relevantes para o estudo. Os picos de fluorescência de cada amostra (anexo 3) correspondem a pesos moleculares (kDa) de proteínas já estabelecidos (anexo 4).

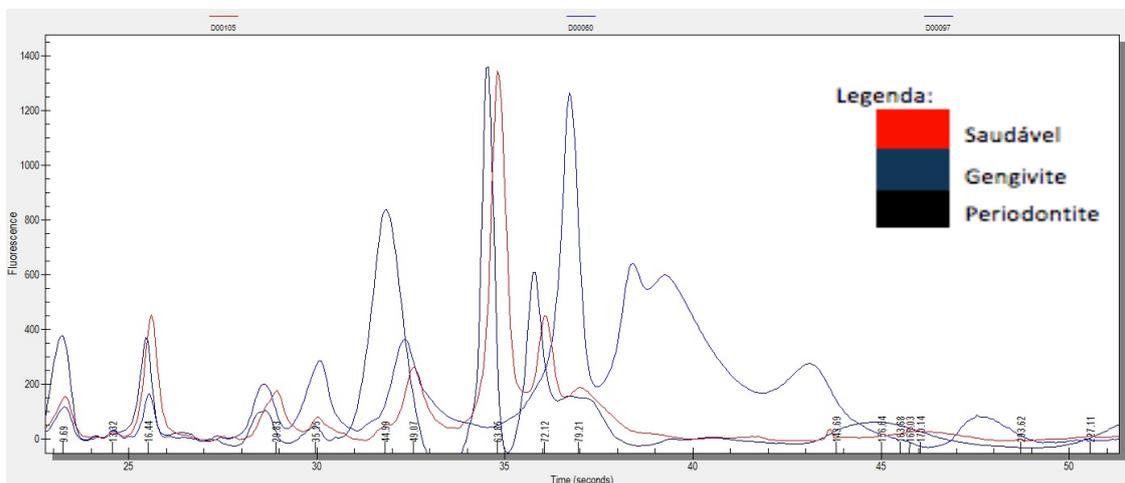


Figura 8 – Eletroferograma tempo de migração/Fluorescência de 3 amostras: Saudável, Gengivite e Periodontite.

O traçado correspondente à amostra de Gengivite apresenta 17 picos de fluorescência, o traçado correspondente à amostra de saudável apresenta 18 picos de fluorescência, e o traçado correspondente à amostra Periodontite apresenta cerca de 12 picos de fluorescência (anexo 3). Foram encontradas correspondências entre os picos de fluorescência e os valores aproximados dos pesos moleculares já tabelados (anexo 4). O resumo das correspondências das proteínas encontra-se na tabela 4.

Tabela 4 – Resumo das correspondências das proteínas correspondentes ao perfil proteico de cada crupo de estudo (S, G e P), observado no traçado da figura 8, com base nos pesos moleculares já estabelecidos (Anexo 4).

Amostra (grupo de Estudo)	Proteínas associadas (com base no perfil proteico estabelecido na Figura 6) (anexo 4)																
	Cystatin-A (Cystatin-AS)	Protein S100-A8 (Calgranulin-A)	Ig mu chain C region	Protein S100-A9 (Calgranulin-B)	Cystatin-SA (Cystatin-2)	Cystatin-SN (Cystatin-SA-I)	Cystatin-S (Cystatin-4)	Cystatin-C (Cystatin-3)	14-3-3 protein sigma	Serpin B13	Zinc-alpha-2-glycoprotein (Zn-alpha-2-GP)	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	Carbonic anhydrase 6	Kallikrein-1	BPI fold-containing family B member 2	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1	Alpha-1-antitrypsin
(P)	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x					
(G)				x	x	x	x	x				x	x				x
(S)			x		x	x	x	x		x			x	x	x	x	

7.3. Quantificação de CCL3 e CCL13

A Figura 9 (A, B) mostra a variabilidade das concentrações de CCL3 e CCL13 entre os grupos S e G. As amostras de *whole saliva* dos participantes foram analisadas por Tecnologia Multiplex (115). Os valores de *p* foram calculados através do Teste Mann-Whitney não emparelhado (Figura 9 A e B), e não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

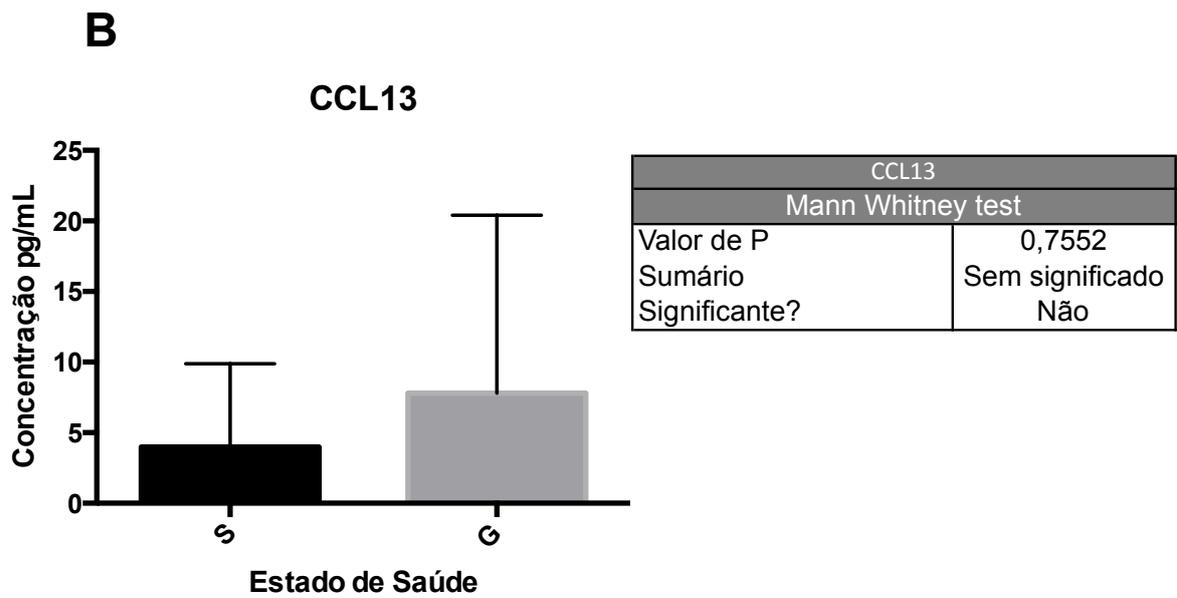
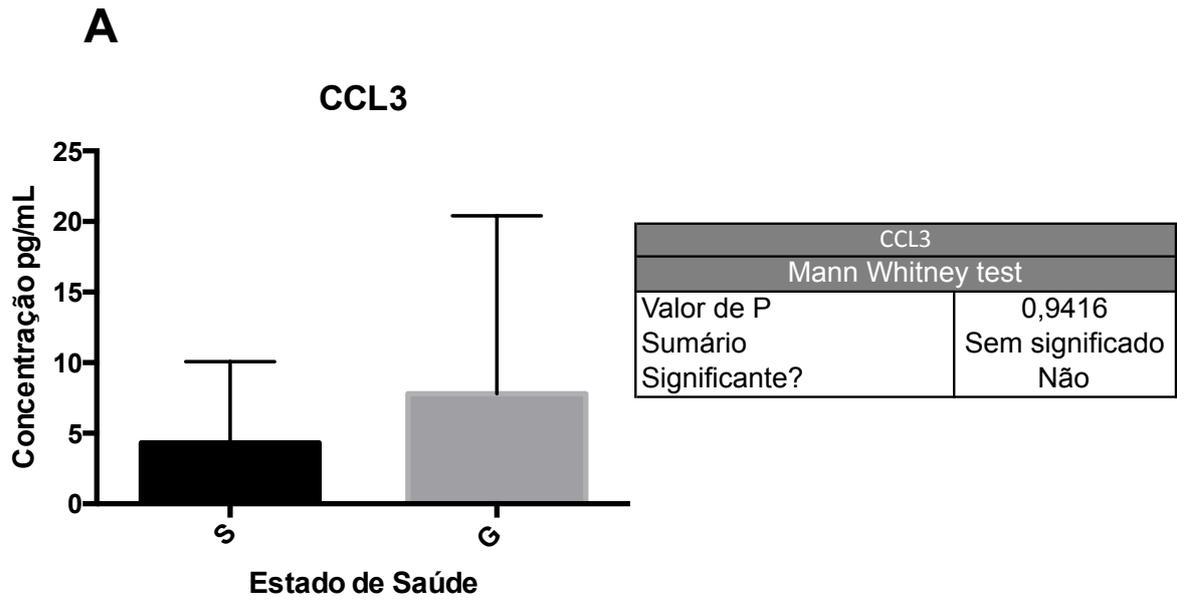


Figura 9 - A) Concentração de CCL3 nos grupos S e G e resultados estatísticos. B) Concentração de CCL13 nos grupos S e G e resultados estatísticos.

Usando a mesma tecnologia, foi realizado um novo teste adicionando mais um grupo de estudo, o grupo da Periodontite (P) do trabalho de Hortênsio *et al* (114). Na figura 10 (A e B) observa-se a variabilidade das concentrações de CCL3 e CCL13 entre os grupos S, G e P. Aplicando o teste de Kruskal-Wallis não emparelhado com comparações múltiplas entre grupos, para cada quimiocina, os valores de p obtidos não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) (Figura 10 A e B).

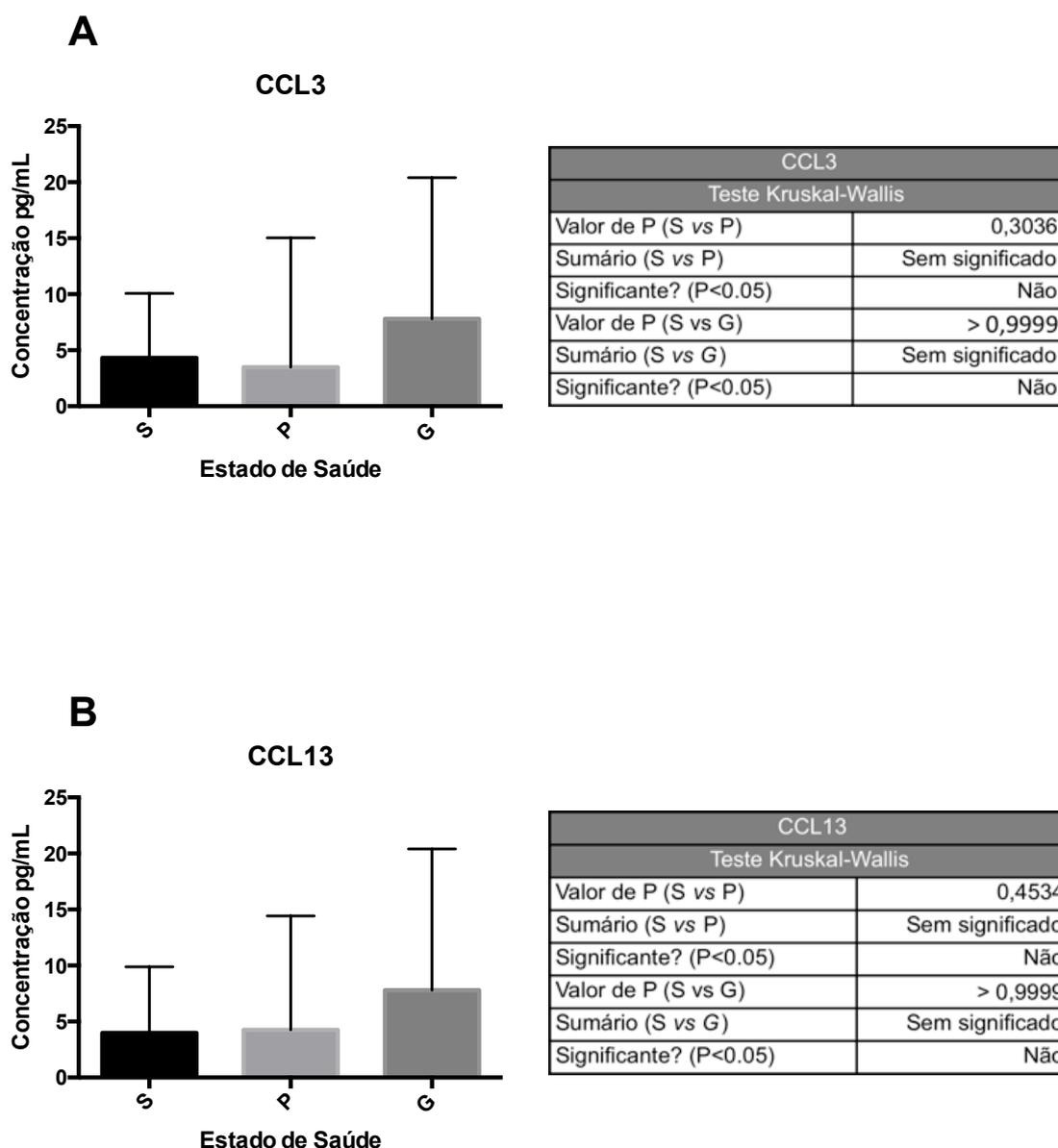


Figura 10 – A) Concentração de CCL3 nos grupos S, P e G e resultados estatísticos. B) Concentração de CCL13 nos grupos S, P e G e resultados estatísticos.

7.4. Correlação entre as concentrações de CCL3 e CCL13 com os parâmetros clínicos

Aplicando o teste de correlação de Pearson para o BOP e IP dos grupos S e G com as concentrações de CCL3 e CCL13, obtiveram-se os resultados sumariados na tabela 7. Os valores de p obtidos não foram estatisticamente significativos, não havendo correlação entre os parâmetros clínicos e a concentração das quimiocinas.

Tabela 7 – Coeficiente de Correlação de Pearson que compara as concentrações de CCL3 e CCL13 dos grupos S e G ao IP e BOP dos mesmos grupos. Significativamente estatístico se $p < 0,05$.

Coeficiente de Correlação de Pearson com:		
	IP	BOP
CCL3	0,3483	0,0947
CCL13	0,8156	0,0719

8. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo era identificar e quantificar as quimiocinas CCL3 e CCL13 na saliva de pacientes com Gengivite e saudáveis. Até ao ano de 2012, não havia estudos que relatassem a presença da CCL13 na saliva, tendo sido apenas encontrada em amostras de FCG (41). O mesmo se verifica para a CCL3, que até a essa data só tinha sido detetada no plasma (116).

Recentemente, a CCL3 foi identificada em amostras de saliva de Pacientes adolescentes saudáveis e sem DP e em pacientes saudáveis com Periodontite Agressiva (117), e foi também identificada nas amostras de saliva deste estudo. Com este estudo fica demonstrado que é possível encontrar e quantificar CCL3 na saliva.

A Gengivite é uma condição inflamatória aguda e reversível do periodonto, induzida por uma disbiose do microbiota oral e regulada pela resposta imune do hospedeiro (15). Esta resposta aguda é essencialmente controlada pelas células da Imunidade Inata, contudo a produção de citocinas e quimiocinas pode alterar o curso da inflamação aguda e torná-la crónica, transformando a resposta imune inata em adaptativa. A inflamação periodontal determina os níveis de quimiocinas produzidas (118). Nos resultados obtidos, o valor de p obtido no teste de Mann-Whitney que comparou os valores de BOP nos grupos S e G foi estatisticamente significativo ($<0,0001$), o que pressupõe uma clara diferença na percentagem de sangramento à sondagem entre os dois grupos. Isto significa que uma baixa percentagem de BOP indica uma condição estável da DP (119). No seguimento deste resultado, a concentração das CCL3 e CCL13, apesar de não ser estatisticamente significativa entre os grupos, apresentou um valor maior no grupo G do que no grupo S.

Tendo em conta esta informação, e perante os resultados obtidos, pode confirmar-se que a CCL3 e CCL13 estão presentes na saliva em condições

de inflamação periodontal, pois são secretadas por leucócitos ativados, células endoteliais e epiteliais quando há um estímulo inflamatório. Apesar dos valores encontrados não serem estatisticamente diferentes entre os grupos de estudo (figura 9), elas estão presentes em indivíduos que apresentam uma condição inflamatória como a Gengivite.

A principal limitação deste estudo prende-se com a quantidade reduzida de amostras que não permite extrapolar estes resultados para a população. Adicionalmente, o número de indivíduos do sexo masculino nesta amostra é muito inferior aos do sexo feminino, o que não permite considerar diferenças de género que poderiam estar presentes. Khan (116) numa análise de 48 moléculas, em 10 indivíduos do sexo masculino e 10 do sexo feminino concluiu que havia algumas moléculas cuja presença e quantificação dependiam do género (*gender-specific*), particularmente na saliva e plasma.

Neste estudo, a correlação obtida para os parâmetros clínico BOP e IP com as concentrações das CCL3 e 13 não foi estatisticamente significativa. Estes resultados estão por isso de acordo com um estudo que relata a correlação existente entre os parâmetros clínicos (neste caso o índice gengival, que é um índice semelhante ao BOP) e a concentração de CCL13 (MCP-4) (120).

Tendo em conta que o presente estudo compara essencialmente indivíduos com Gengivite com indivíduos saudáveis, os resultados de quantificação das CCL3 e 13 e os valores de p estatisticamente não significativos fazem sentido, uma vez que estes marcadores evidenciam um estado mais avançado da DP em que já há perda de tecido conjuntivo e ósseo, o que não acontece na Gengivite (11,12). Perante estes resultados, e para que fosse possível cumprir o objetivo de determinar se estes marcadores poderiam ajudar no diagnóstico diferencial de Periodontite crónica e Gengivite, foram comparados os resultados obtidos neste trabalho com os de Hortênsio (114). Dessa comparação (Figura 10), as diferenças obtidas não são estatisticamente significativas, estando inclusive a concentração de CCL 3 no grupo P mais baixa que no Grupo G. Seria proveitoso ampliar o número de amostras analisadas para aumentar o poder estatístico dos testes aplicados.

A CCL3 é quimiotática para PMNs na inflamação aguda, e é estimulatória para os monócitos em relação à osteoclastogénese; pode ainda ativar osteoclastos em sinergia com IL-1 β (121). Os resultados obtidos por Fine *et al* suportam que elevados níveis de CCL3 na saliva podem ser usados para identificar indivíduos suscetíveis à perda óssea, mas não é preditivo da sua evolução (117). O estudo deste autor foi o primeiro a implicar a CCL3 como um biomarcador preditivo de risco, com grande especificidade e sensibilidade tanto na saliva como no FCG da zona específica que desenvolve perda óssea periodontal, num estudo longitudinal tipo *cohort* (117). No que toca ao presente estudo não podemos dizer que é um biomarcador preditivo pois na perda óssea periodontal, isto é, o CAL, foi definido como ≥ 0 mm nos critérios de inclusão. Acresce o facto de este não ser um estudo longitudinal.

Muitos estudos identificaram como potenciais fontes de CCL13 as células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, sob condições inflamatórias apropriadas (44). Kumari *et al* mostraram no seu estudo que os níveis de CCL13 no FCG aumentaram da saúde Periodontal para a Gengivite e posteriormente aumentaram desta para a Periodontite Crónica. Estes resultados estão em concordância com o presente estudo relativamente ao aumento da concentração de CCL13 na saúde Periodontal para a Gengivite, mas não estão em concordância no aumento desta para a Periodontite, possivelmente devido ao reduzido número de amostras do grupo P.

A quimiocina CCL13 (em conjunto com a proteína C-reativa) está proposta como potencial biomarcador inflamatório da DP e da saúde Periodontal num estudo realizado por Kumari *et al* (122). A camada bacteriana de LPS é considerada como uma forte indutora das MCPs (*monocyte chemoattractant protein*), e uma grande concentração de CCL13 (MCP-4) pode ser devida à indução de um patogénico periodontal (como a *P. gingivalis*), que causa a produção local de CCL13 por várias células nas zonas com DP (43). Assim, a CCL13 pode desempenhar uma função muito importante na amplificação de sinais inflamatórios e na progressão da DP (50).

Uma das limitações deste estudo é na avaliação do potencial de progressão da DP através da identificação dos biomarcadores, uma vez que foi feita uma única avaliação clínica dos participantes no início do estudo, não havendo uma comparação entre “antes” e “depois” dos resultados, ao contrário de outros estudos (117,123). Em condições ideais, as quimiocinas deviam ser estudadas de um modo dependente do tempo e local, de forma a correlacionar os valores encontrados nesse local e nesse tempo, no contexto da doença em desenvolvimento (117). Uma vez que a rede de citocinas e quimiocinas é complexa, interativa, muda continuamente e tem uma funcionalidade redundante, a interpretação dos níveis de citocinas referente a um período no tempo terá de ser validada previamente por estudos longitudinais (124). Só este tipo de estudo permitiria aferir se estes biomarcadores poderão ser utilizados para avaliar o potencial de progressão da DP.

9. CONCLUSÃO

A Gengivite e a Periodontite são duas Doenças Periodontais cuja imunopatogénese está intrinsecamente ligada, e não devem ser encaradas como duas doenças separadas mas antes como dois processos inflamatórios que pressupõem uma evolução em sinergia. Assim, os estudos ómicos na área da Biologia Molecular, Imunologia e Periodontologia vão permitir, no futuro, o estabelecimento de mapas moleculares e constituição de biomarcadores de risco e/ou preditivos mais sólidos da DP.

Os resultados preliminares obtidos no presente estudo não suportam a utilidade da CCL3 e CCL3 como biomarcadores para a Gengivite, pelo que não podem ser recomendadas para esse efeito.

Apesar dos resultados obtidos, o trabalho e metodologia desenvolvidos neste estudo são um bom ponto de partida para o alargamento do estudo de biomarcadores salivares a outras moléculas envolvidas na resposta imune.

Este estudo provou que as CCL3 e 13 estão presentes na saliva, embora em baixas concentrações. Em estudos futuros, será necessário o estabelecimento de uma amostra de maiores dimensões, para que os resultados de quantificação (diferentes) possam identificar fenómenos distintos da população em estudo.

Em suma, devem ser consideradas novas estratégias para estudar quer estas quimiocinas quer outras moléculas, como o caso da DEFA 3 proposta por Rosa *et al* como potencial biomarcador de diagnóstico diferencial entre Gengivite e Periodontite Crónica (41).

10. BIBLIOGRAFIA

1. Huan N, Gibson III FC. Immuno-Pathogenesis of Periodontal Disease: Current and Emerging Paradigms. *Curr Oral Heal Rep*. 2014;1:124–32.
2. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2001;25(1):8–20.
3. Taylor JJ. Protein Biomarkers of Periodontitis in Saliva. *Inflammation*. 2014;1–19.
4. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(7):481–90.
5. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal Diseases. *Lancet*. 2005;366(9499):1809–20.
6. Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. Principles of periodontology. *Periodontol 2000*. 2013;61(357):16–53.
7. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2014;64(12):57–80.
8. Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol*. 2005;76(December):2187–93.
9. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4:1–6.
10. Eberhard J, Grote K, Luchtefeld M, Heuer W, Schuett H, Divchev D, et al. Experimental Gingivitis Induces Systemic Inflammatory Markers in Young Healthy Individuals: A Single-Subject Interventional Study. *PLoS One*. 2013;8(2).

11. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2004;34:9–21.
12. Kim J, Kim C, Camargo P. Salivary biomarkers in the diagnosis of periodontal diseases. *J Calif Dent Assoc*. 2013;41(2):119–24.
13. Barrington EP, Townsed CL. Parameter on Plaque-Induced Gingivitis. *J Periodontol*. Chicago, Illinois; 2000;71(5):851.
14. Armitage GC. Periodontal diseases: Diagnosis. *Ann Periodontol*. 1996;1(1):37–275.
15. Hajishengallis G. Periodontitis : from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Publ Gr. Nature Publishing Group*; 2015;15(1):30–44.
16. Kayal RA. The Role of Osteoimmunology in Periodontal Disease. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1–10.
17. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J*. 2009;54(Suppl. 1):S2–10.
18. Seymour GJ. Importance of the host response in the periodontium. *J Clin Periodontol*. 1991;18:421–6.
19. Zia A, Khan S, Bey A, Nd G. Oral biomarkers in the diagnosis and progression of periodontal diseases. *Biol Med*. 2011;3(2 (Special Issue)):45–52.
20. Alves Perez D, Vago JP, Athayde RM, Reis AC, Teixeira MM, Sousa LP, et al. Switching Off Key Signaling Survival Molecules to Switch On the Resolution of Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:1–9.
21. Kinane DF, Berglundh T, Lindhe J. Pathogenesis of Periodontitis. Em: Lindhe J, Lang NP, Karring T, editores. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Fifth. Blackwell Munksgaard; 2008. p. 285–306.

22. Ge X, Rodriguez R, Trinh M, Gunsolley J, Xu P. Oral microbiome of deep and shallow dental pockets in chronic periodontitis. *PLoS One*. 2013;8(6).
23. Kinane DF, Lappin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand*. 2001;59(3):154–60.
24. Huang N, Gibson III FC. Immuno-Pathogenesis of Periodontal Disease: Current and Emerging Paradigms. *Curr Oral Heal Rep*. 2014;1:124–32.
25. Guo Y, Nguyen KA, Potempa J. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontol 2000*. 2010;54:15–44.
26. Sheets SM, Robles-Price AG, McKenzie RM, Casiano CA, Fletcher HM. Gingipain-dependent interactions with the host are important for survival of *Porphyromonas gingivalis*. *Front Biosci*. 2008;13:3215–38.
27. Sahingur SE, Yeudall WA. Chemokine Function in Periodontal Disease and Oral Cavity Cancer. *Front Immunol*. 2015;6(May):1–15.
28. Kulkarni C, Kinane DF. Host response in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* [Internet]. 2014;65(1):79–91. Obtido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24738587>
29. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*. 1976;34:235–49.
30. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2015;16(4):343–53.
31. Ribeiro Souto G, Queiroz CM, Nogueira Guimarães De Abreu MH, Oliveira Costa F, Alves Mesquita R. Pro-inflammatory, Th1, Th2, Th17

- cytokines and dendritic cells: A cross-sectional study in chronic periodontitis. *PLoS One*. 2014;9(3).
32. Van Dyke TE, Van Winkelhoff AJ. Infection and inflammatory mechanisms. *J Clin Periodontol*. 2013;40(SUPPL. 14).
 33. Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, et al. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2009;44:21–7.
 34. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med*. 2013;15(e7):1–22.
 35. Sokol CL, Luster AD. The Chemokine System in Innate Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7:1–20.
 36. Silva T a, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007;86(4):306–19.
 37. Berglundh T, Donati M. Aspects of adaptative host response in periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;32(6):87–207.
 38. Kinane DF, Attrom R. Advance in the pathogenesis of periodontitis. Group B consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2005;32(6):130–1.
 39. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*. Elsevier Ltd; 2014;35(1):3–11.
 40. Luster AD. Mechanisms of disease: chemokines — chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 1998;338(7):436–45.
 41. Rosa N, Correia MJ, Arrais JP, Costa N, Oliveira JL, Barros M. The landscape of protein biomarkers proposed for periodontal disease:

- Markers with functional meaning. *Biomed Res Int*. Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014:1–15.
42. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, et al. Macrophage inflammatory protein-1alpha: a salivary biomarker of bone loss in a longitudinal cohort study of children at risk for aggressive periodontal disease? *J Periodontol*. 2009;80(1):106–13.
 43. Pype JL, Dupont LJ, Menten P. Expression of monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-2, and MCP-3 by human airway smooth-muscle cells. Modulation by corticosteroids and T-helper 2 cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;21:528–36.
 44. Garcia-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME, Sarafi MN, Lavigne F, Hamid QI et al. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and non-allergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol*. 1996;157:5613–26.
 45. Hashimoto I, Wada J, Hida A. Elevated serum monocyte chemoattractant protein-4 and chronic inflammation in overweight subjects. *Obes (Silver Spring)*. 2006;14:799–811.
 46. Iwamoto T, Okamoto H, Iikuni N. Monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4)/CCL13 is highly expressed in cartilage from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol*. 2006;45:421–4.
 47. Breland UM, Michelsen AE, Skjelland M. Raised MCP-4 levels in symptomatic carotid atherosclerosis: an inflammatory link between platelet and monocyte activation. *Cardiovasc Res*. 2010;86:265–73.
 48. Lamkhioued B, Garcia-Zepeda EA, Abi-Younes S. Monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 expression in the airways of patients with asthma. Induction in epithelial cells and mononuclear cells by

- proinflammatory cytokines. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(2 Pt 1):723–32.
49. Chakravorty SJ, Howie AJ, Girdlestone J, Gentle D, Savage CO. Potential role for monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4) in monocyte/macrophage recruitment in acute renal inflammation. *J Pathol.* 2001;194:239–46.
 50. Pradeep AR, Kumari M, Kalra N, Priyanka N. Correlation of MCP-4 and high-sensitivity C-reactive protein as a marker of inflammation in obesity and chronic periodontitis. *Cytokine [Internet].* 2013;61(3):772–7. Obtido de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.12.022>
 51. Wilensky A, Segev H, Mizraji G, Shaul Y, Capucha T, Shacham M, et al. Dendritic cells and their role in periodontal disease. *Oral Dis.* 2014;20(2):119–26.
 52. Dennison DK, Van Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol 2000.* 1997;1997(14):54–78.
 53. Terheyden H, Stadlinger B, Sanz M, Garbe AI, Meyle J. Inflammatory reaction - communication of cells. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25:399–407.
 54. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:159–75.
 55. Caielli S. Neutrophils come of age in chronic inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2012;24:671–7.
 56. Graves DT. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 2011;3.

57. Nussbaum G, Shapira L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? *J Clin Periodontol*. 2011;38:49–59.
58. Ryder MI. Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010;53:124–37.
59. Chakravarti A. Surface RANKL of Toll-like receptor 4- stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood*. 2009;114:1633–44.
60. Pelletier M. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*. 115:335–43.
61. Racz GZ, Kadar K, Foldes A, Kallo K, Percel-Kovach K, Keremi B, et al. Immunomodulatory and potential therapeutic role of mesenchymal stem cells in Periodontitis. *J Physiol Pharmacol*. 2014;65(3):327–39.
62. Wermuth PJ, Jimenez S a. The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases. *Clin Transl Med*. 2015;4(1).
63. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:958–69.
64. Kreider T, Anthony RM, Urban JF, Gause WC. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol*. 2007;19:448–53.
65. Yang J, Sundrud MS, Skepner J, Yamagata T. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. *Trends Pharmacol Sci*. Elsevier Ltd; 2014;1–8.
66. V A, RA van L, F S, M. R. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytom A*. 2008;73:975–83.
67. Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory t cells in the control of host-microorganism interactions. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:551–89.

68. Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Junior WM, Rossi MA, Silva JS. Characterization of CD4⁺ CD25⁺ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol.* 2008;84:311–8.
69. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000.* 2006;80–7.
70. Cutler CW, Jotwani R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2004;35:135–57.
71. Tew JG, El Shikh ME, El Sayed RM, Schenkein HA. Dendritic cells, antibodies reactive with oxLDL, and inflammation. *J Dent Res.* 2012;91:8–16.
72. Bridges RB, Kraal JH, Huang LJ, Chancellor MB. Effects of cigarette smoke components on in vitro chemotaxis of human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* 1977;16:240–8.
73. Hajishengallis G, Abe T, Maekawa T, Hajishengallis E, Lambris JD. Role of complement in host-microbe homeostasis of the periodontium. *Semin Immunol.* 2013;25(1):65–72.
74. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol.* 2012;27:409–19.
75. Sima C, Glogauer M. Neutrophil Dysfunction and Host Susceptibility to Periodontal Inflammation: Current State of Knowledge. *Curr Oral Heal Reports.* 2014;95–103.
76. Sasai M, Yamamoto M. Pathogen recognition receptors: ligands and signaling pathways by toll-like receptors. *Int Rev Immunol.* 2013;32:116–33.

77. McClure R, Massari P. TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens. *Front Immunol.* 2014;5(August):1–13.
78. Scott DA, Krauss J. Neutrophils in periodontal inflammation. *Front Oral Biol.* 2012;15:56–83.
79. Semlali A, Witoled C, Alanazi M, Rouabhia M. Whole cigarette smoke increased the expression of TLRs, HBDs, and proinflammatory cytokines by human gingival epithelial cells through different signaling pathways. *PLoS One.* 2012;7:e52614.
80. Uehara A, Fujimoto Y, Fukase K, Takada H. Various human epithelial cells express functional toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce antimicrobial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol Immunol.* 2007;44:3100–11.
81. Promsudthi A, Poomsawat, S. Limsricharoen W. The role of toll-like receptor 2 and 4 in gingival tissues of chronic periodontitis subjects with type 2 diabetes. *J Periodontal Res.* 2013;49(3):346–54.
82. Hazlett L, Wu M. Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res.* 2011;343:175–88.
83. Papapanou PN, Lindhe J. Epidemiology of Periodontal Diseases. Em: Lindhe J, Lang NP, Karring T, editores. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry. Fifth.* Blackwell Munksgaard; 2008. p. 129–79.
84. Fransson C, Mooney J, Kinane DF, Berglundh T. Differences in the inflammatory response in young and old human subjects during the course of experimental gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1999;26(7):453–60.
85. Archana V, Ambili R, Nisha KJ, Seba A, Preeja C. Acute-phase reactants in periodontal disease: Current concepts and future implications. *J Investig Clin Dent.* 2014;1–10.

86. Ospelt C, Gay S. TLRs and chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42:495–505.
87. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11:373–84.
88. Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Perio.* 2007;43:41–55.
89. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;12:677–86.
90. Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1601–8.
91. Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2010;53:55–69.
92. Spielmann N, Wong DT. Saliva: Diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis.* 2011;17:345–54.
93. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann NY Acad Sci.* 1993;694:72–7.
94. Cuevas-Córdoba B, Santiago-García J. Saliva: a fluid of study for OMICS. *OMICS.* 2014;18(2):87–97.
95. Navazesh M, Kumar SK. Measuring salivary flow: Challenges and opportunities. *Am Dent Assoc J.* 2008;139:35S – 40S.
96. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta.* 2007;383:30–40.
97. Tiwari M. Science behind human saliva. *J Nat Sci Biol Med.* 2001;2:53–8.

98. Fuentes L, Yakob M, Wong DTW. Emerging horizons of salivary diagnostics for periodontal disease. *Br Dent J*. Nature Publishing Group; 2014;217(10):567–73.
99. Yeh C, Christodoulides NJ, Floriano PN, Miller CS, Ebersole JL, Weigum SE, et al. Current Development of Saliva/Oral fluid-based Diagnostics. *Tex Dent J*. 2010;127(7):651–61.
100. Silberring J, Ciborowski P. Biomarker discovery and clinical proteomics. *Trends Anal Chem*. 2010;29:128–40.
101. Ilyin SE, Belkowski SM, Plata-Salaman CR. Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. *Trends Biotechnol*. 2004;22:411–6.
102. Yoshizawa JM, Schafer C a., Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DTW. Salivary biomarkers: Toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:781–91.
103. Ulker AE, Tulunoglu O, Ozmeric N, Can M, Demirtas S. The evaluation of cystatin C, IL-1beta, and TNF-alpha levels in total saliva and gingival crevicular fluid from 11- to 16-year-old children. *J Periodontol*. 2008;79:854–60.
104. Morelli T, Stella M, Barros SP, Marchesan JT, Moss KL, Kim SJ, et al. Salivary Biomarkers in a Biofilm Overgrowth Model. *J Periodontol*. 2014;85:1–13.
105. Grant MM, Creese AJ, Barr G, Ling MR, Scott AE, Matthews JB, et al. Proteomic analysis of a noninvasive human model of acute inflammation and its resolution: The twenty-one day gingivitis model. *J Proteome Res*. 2010;9(9):4732–44.
106. Syndergaard B. Salivary Biomarkers Associated with Gingivitis and Response to Therapy. *J Periodontol*. 2014;85(8):295–303.

107. Ertugrul AS, Sahin H, Dikilitas A, Alpaslan N, Bozoglan A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis. *J Periodontal Res.* 2013;48(1):44–51.
108. Tsilingaridis G, Yucel-Lindberg T, Concha Quezada H, Mod er T. The relationship between matrix metalloproteinases (MMP-3, -8, -9) in serum and peripheral lymphocytes (CD8(+) , CD56(+)) in Down syndrome children with gingivitis. *J Periodontal Res.* 2013;
109. Larmas M. Has dental caries prevalence some connection with caries index values in adults? *Caries Res.* 2010;44(1):81–4.
110. Silness J, Loe H. Periodontal Disease in Pregnancy II. Correlation Between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta odont scand.* 1964;22(1):121–35.
111. Kardeřler L, Buduneli N,  etinkalp S, Lappin D, Kinane DF. Gingival crevicular fluid IL-6, tPA, PAI-2, albumin levels following initial periodontal treatment in chronic periodontitis patients with or without type 2 diabetes. *Inflamm Res.* Fevereiro de 2011;60(2):143–51.
112. Hill EG, Slate EH, Wiegand RE, Grossi SG, Salinas CF. Study design for calibration of clinical examiners measuring periodontal parameters. *J Periodontol.* 2006;77(July):1129–41.
113. Osborn J, Stoltenberg J, Huso B, Aepli D, Pihlstrom B. Comparison of measurement variability in subjects with moderate periodontitis using a conventional and constant force periodontal probe. *J Periodontol.* 1992;63:282–9.
114. Hort ensio A, Barros M. Identifica o de Biomarcadores Salivares de Doença Periodontal em Pacientes com Periodontite e Diabetes Mellitus Tipo 2. Universidade Cat lica Portuguesa do Centro Regional das Beiras; 2015.

115. Houser B. Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. *Arch Physiol Biochem*. Outubro de 2012;118(4):192–6.
116. Khan A. Detection and quantitation of forty eight cytokines, chemokines, growth factors and nine acute phase proteins in healthy human plasma, saliva and urine. *J Proteomics* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;75(15):4802–19. Obtido de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.018>
117. Fine DH, Markowitz K, Fairlie K, Tischio-Bereski D, Ferrandiz J, Godbole D, et al. Macrophage inflammatory protein-1 α shows predictive value as a risk marker for subjects and sites vulnerable to bone loss in a longitudinal model of aggressive periodontitis. *PLoS One*. 2014;9(6).
118. Haytural O, Yaman D, Ural EC, Kantarci a., Demirel K. Impact of periodontitis on chemokines in smokers. *Clin Oral Investig* [Internet]. 2014;19(5):979–86. Obtido de: <http://link.springer.com/10.1007/s00784-014-1314-2>
119. Gonzalez S, Cohen CL, Galván M, Alonzaizan F a., Rich SK, Slots J. Gingival bleeding on probing: Relationship to change in periodontal pocket depth and effect of sodium hypochlorite oral rinse. *J Periodontal Res*. 2014;
120. Pradeep AR, Kumari M, Priyanka N, Kalra N, Martande SS, Naik SB. MCP-4 and Progranulin: Novel Biomarkers Linking Periodontitis and Obesity. Em: Bartold PM, Nagata T, editores. *The Past, Present and Future of Periodontology*. 2013.
121. Ryu OH, Choi SJ, Linares AM, Song IS, Kim, Y.J et al. Gingival epithelial cell expression of macrophage inflammatory protein-1-alpha induced by interleukin-1-beta and lipopolysaccharide. *J Periodontol*. 2007;78:1627–34.

122. Kumari M, Pradeep A, Priyanka N, Kalra N, Naik SB. Crevicular and serum levels of monocyte chemoattractant protein-4 and high-sensitivity C-reactive protein in periodontal health and disease. *Arch Oral Biol.* Elsevier Ltd; 2014;59(6):645–53.
123. Nomura Y, Shimada Y, Hanada N. Salivary biomarkers for predicting the progression of chronic periodontitis. *Arch Oral Biol.* Elsevier Ltd; 2012;57:413–20.
124. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17 the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:652–7.
125. Florindo A, Latorre M. Validação e reprodutibilidade do questionário de Baecke de avaliação da atividade física habitual em homens adultos. *Rev Bras Med Esporte.* 2003;9(11):121–8.

11. APÊNDICE

Questionário de Dadores

1. Informação geral acerca do dador

1.1 Data nascimento: ____/____/____

1.2 Género:

Masculino Feminino

1.3 Dados Biométricos:

Altura: _____ Cm Peso: _____ Kg Perímetro Abdominal: _____
cm

1.4 Etnia:

Caucasiana Negra Asiática Cigana

Outra. Qual? _____

1.5 Área de residência:

Aldeia Vila Cidade

1.6 Estado civil:

Solteiro Casado Vive maritalmente Viúvo
Divorciado

1.7 Nível de escolaridade:

Básico (abaixo do 9º Ano) Médio (12º Ano)

Licenciatura, Mestrado e/ou Doutoramento

1.8 Profissão: _____

2. Hábitos Tabágicos

2.1 Fuma ou já fumou?

Não Sim

Ex-fumador. Há quantos anos deixou de fumar? _____ Anos

2.2 Se sim:

2.2.1 Com que idade começou a fumar: _____ anos

2.2.2 Quantos cigarros fuma por dia: _____ cigarros

3. Consumo de Álcool

3.1 Bebe bebidas alcoólicas?

Não Passe para a questão 4 Sim.

Com que idade começou a beber: _____ anos

3.2 Frequência do consumo de álcool Nº copos de vinho/semana _____ Nº
cervejas/semana _____

Nº de digestivos/semana) _____

3.3 Deixou de beber?

Não Sim. Há quantos anos deixou de beber? _____ anos.

4. Exercício Físico

Questionário de Baecke para Avaliação da actividade física habitual em adultos (125) (Adaptado)					
Por favor, circule a resposta apropriada para cada questão pensando nos últimos 12 meses					
1. Você pratica ou praticou desporto ou exercício físico nos últimos 12 meses:	Sim		Não		
1.1 Qual desporto ou exercício físico pratica ou praticou mais frequentemente?					
1.1.1 Quantas horas por semana?					
1.1.2 Quantos meses por ano?					
1.2 Se pratica ou praticou outro desporto ou exercício físico além do anterior, qual o tipo?	Sim		Não		
1.2.1 Quantas horas por semana?					
1.2.2 Quantos meses por ano?					
	1	2	3	4	5
2. Em comparação com outros da minha idade, eu penso que minha atividade física durante as horas de lazer é:	Muito menor	Menor	A mesma	Maior	Muito maior
3. Durante as horas de lazer eu suo:	Nunca	Raramente	Algumas vezes	Frequentemente	Muito frequentemente
4- Durante as horas de lazer eu pratico desporto ou exercício físico:	Nunca	Raramente	Algumas vezes	Frequentemente	Muito frequentemente
5. Durante as horas de lazer eu vejo televisão:	Nunca	Raramente	Algumas vezes	Frequentemente	Muito frequentemente
6. Durante as horas de lazer eu ando:	Nunca	Raramente	Algumas vezes	Frequentemente	Muito frequentemente
7. Durante as horas de lazer eu ando de bicicleta:	Nunca	Raramente	Algumas vezes	Frequentemente	Muito frequentemente
8. Durante quantos minutos por dia você anda a pé ou de bicicleta indo e voltando do trabalho, escola ou compras? Total de minutos: _____	< 5	5-15	16-30	31-45	> 45

1-Florindo A, Latorre M. Validação e reprodutibilidade do questionário de Baecke de avaliação da atividade física habitual em homens adultos. Rev Bras Med Esporte [Internet]. 2003 [cited 2014 Dec 15];9(11):121-8. Available from: http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Validação+e+reprodutibilidade+do+questionário+de+Baecke+de+avaliação+da+atividade+física+habitual+em+homens+adultos+*#0

5. Hábitos Alimentares

	Nunca (0 vezes/ semana)	Raramente (1 a 2 vezes/semana)	Algumas vezes (3 a 4 vezes/semana)	Muitas vezes (5 a 6 vezes/semana)	Sempre (7 ou mais vezes/semana)
Após acordar tenho por hábito tomar o café da manhã.					
Como e mastigo devagar.					
Passo muitas horas sem comer.					
Faço 5 ou 6 refeições por dia.					
Faço refeições com intervalos de 3 a 4 horas.					
O jejum nocturno não ultrapassa as 10 horas.					
Ingiro leite/iogurte/queijo.					
Como fruta.					
Como legumes e hortaliças.					
Como sopa.					
Como alimentos integrais ricos em fibra.					
Como carnes gordas.					
Como carnes magras.					
Adiciono aos alimentos produtos industriais.					
O azeite faz parte da minha alimentação.					
Consumo molhos gordos.					
Como pizzas, hambúrgueres e cachorros-quentes.					
Consumo produtos de charcutaria.					
Prefiro a comida com um pouco de sal a mais.					
Ingiro alimentos salgados.					
Ingiro alimentos ricos em açúcar.					
No lanche, como um bolo ou um salgado.					
Quando como um doce opto por fazê-lo...					
Prefiro comer bolos/bolachas do que comer pão.					
Utilizo bastante açúcar para adoçar.					
Adopto uma alimentação variada às refeições.					
Faço uma refeição de peixe.					
Faço uma alimentação à base de cozidos e grelhados.					
Costumo comer as partes queimadas dos alimentos.					
Como alimentos fritos e assados no forno.					
Faço refeições abundantes.					
Petisco entre refeições.					
Como quase sempre o mesmo tipo de alimentos.					
Consumo bebidas alcoolicas fora das refeições.					
Só bebo água quando tenho sede.					
Bebo pelo menos 1,5 L de água por dia.					
Consumo alimentos pré-cozinhados e enlatados.					
Como pão de mistura tipo caseiro.					
Como arroz/massa e batata.					
Como peixes gordos.					

Marques A, Luzio F, Martins J, Vaquinhas M. Hábitos alimentares: Validação de uma escala para a população portuguesa. Esc Anna Nery. 2011;15(2): 402-9.

6. Saúde

6.1 Grupo Sanguíneo

- A B AB O
 Rh+ Rh-
 Não sabe

6.2 Toma regularmente medicamentos?

- Não Sim

6.3 Indique todos os medicamentos que toma regularmente:

Medicação (DCI)	mg	Há quantos anos começou

6.4 Tomou alguma medicação que não seja a indicada na tabela acima referida nos últimos 30 dias?

- Não Sim. Qual? _____

6.5 Tomou algum antibiótico nos últimos 3 meses?

- Não Sim. Qual? _____

6.6 Tomou corticosteroides nos últimos 30 dias?

- Não Sim

6.7 Tomou bifosfonatos nos últimos 30 dias?

- Não Sim

6.8 Tem as vacinas em dia?

- Não Sim

→ **Se é homem passe para a questão 6.13.**

6.9 Está grávida?

- Não Sim. De quantos meses? _____ meses.

6.10 Encontra-se na menopausa?

- Não Sim. Há quanto tempo? _____ meses.

6.11 Há quanto tempo teve a última menstruação? _____ dias.

6.12 Toma anticoncepcionais?

- Não Sim. Qual? _____

6.13 Nos últimos 12 meses foi consultado por um médico?

- Não Sim

6.14 Se sim, que especialidade? (Pode seleccionar mais do que uma opção)

- Médico de consulta geral e familiar Dermatologista
 Gastroenterologia Ortopedista
 Outro (s) _____

6.15 Qual a data das últimas análises que efectuou? ____/____/____

6.16 Foram encontrados valores anormais?

- Não Sim. Quais? _____

6.17 Tem hipertensão?

- Não Sim

6.18 Atualmente sofre de alguma enfermidade?

- Não Sim

6.19 Se sim, qual? (Pode seleccionar mais do que uma opção)

- Problemas cardíacos:
- Doença das artérias coronárias Ataque cardíaco
 - Angina Aneurisma da aorta
 - Arritmias Doença cardíaca congénita
 - Insuficiência cardíaca Doença cardíaca reumática
 - Outro(s) _____

Diabetes:

- Tipo 1 Tipo 2

Análise Clínica	Valores
Colesterol	
Glicose	
Resistência à insulina	
Hemoglobina glicosilada	
AGEs	

Doenças auto-imunes:

- Doença de Crohn Doença de Behçet
 Doença de Graves Síndrome de Sjogren
 Outra: _____

- Doenças de sangue. Quais? _____

- Doenças infeto-contagiosas. Quais? _____
 - Doenças de fígado. Quais? _____
 - Problemas de estômago. Quais? _____
 - Problemas renais. Quais? _____
 - Epilepsia
 - Asma
 - Urticária
 - Sinusite
 - Acne
 - Outra (s).
Quais? _____
-

6.20 Alergias

6.20.1 É alérgico a algum medicamento ou dispositivo médico?

- Não Sim. **Qual?** _____

6.20.2 É alérgico a algum alimento?

- Não Sim. **Qual?** _____

6.20.3 É alérgico a picadas de insetos?

- Não Sim. **Qual?** _____

6.21 Foi sujeito a algum tratamento de radioterapia ou quimioterapia?

- Não Sim. **Há quanto tempo?** _____ meses.

6.22 História Familiar – Existem doenças na família como:

- Doenças Cardíacas Diabetes Cancro Não sabe
- Outras, quais? _____

7. Patologia do sono

Sono (Escala de sonolência de Epworth, adaptada por Santos CR (2001))	Nunca	Raramente	Por vezes	Frequentemente	N/A	24-Score
Nas últimas duas semanas:						
adormeceu sentado e a ler						
adormeceu a ver tv						
adormeceu sentado em local público						
adormeceu como passageiro de um carro, uma hora sem intervalo						
adormeceu deitado para descansar após o almoço						
adormeceu sentado e a falar com alguém						
adormeceu sentado após o almoço sem ingerir álcool						
adormeceu a conduzir um carro em tráfego lento						
Ao deitar teve dificuldade de dormir?						
Acordou durante o sono e teve dificuldade para adormecer de novo?						
Acordou muito cedo e não conseguiu voltar a adormecer?						

8. Escala de Felicidade Subjectiva (SHS)

Desenvolvida por: Sonja Lyubomirsky.

Instruções: Para cada uma das seguintes frases, por favor, escolha o ponto da escala que o descreve de forma mais apropriada.

1 2 3 4 5 6 7

Uma
pessoa
não muito
feliz

Uma
pessoa
muito feliz

1	Em geral, considero-me:	
2	Comparado com os meus pares, considero-me:	
3	Algumas pessoas são geralmente muito felizes. Apreciam a vida independentemente do que se passa à sua volta, aproveitando o melhor de tudo. Como considera essa pessoa?	
4	Algumas pessoas não são geralmente felizes. Embora não estejam deprimidas, nunca parecem tão felizes como poderiam ser. Como considera essa pessoa?	

9. Escala de Satisfação com a Vida (SWLS)

Desenvolvida por: Ed Diener

Instruções: Abaixo encontrará cinco afirmações com as quais pode ou não concordar. Usando a escala de resposta a seguir, que vai de 1 a 7, indique o quanto concorda ou discorda com cada uma; escreva um número no espaço ao lado da afirmação, segundo sua opinião. Por favor, seja o mais sincero possível nas suas respostas.

- 7 = Concordo totalmente
- 6 = Concordo
- 5 = Concordo ligeiramente
- 4 = Nem concordo nem discordo
- 3 = Discordo ligeiramente
- 2 = Discordo
- 1 = Discordo totalmente

1. _____ Na maioria dos aspectos, a minha vida é próxima ao meu ideal.
2. _____ As condições da minha vida são excelentes.
3. _____ Estou satisfeito(a) com minha vida.
4. _____ Dentro do possível, tenho conseguido as coisas importantes que quero da vida.
5. _____ Se pudesse viver uma segunda vez, não mudaria quase nada na minha vida.

10. Questionário de Qualidade de Vida, Saúde e Outras Áreas

Este questionário procura conhecer a sua qualidade de vida, saúde e outras áreas da sua vida. Por favor, tenha presente os seus padrões, expectativas, alegrias e preocupações. Pedimos-lhe que tenha em conta a sua vida nas duas últimas semanas.

Coloque um círculo à volta do número que melhor descreve a sua situação.

		Muito Má	Má	Nem Boa Nem Má	Boa	Muito Boa
1 (G1)	Como avalia a sua qualidade de vida?	1	2	3	4	5

		Muito Insatisfeito	Insatisfeito	Nem satisfeito nem insatisfeito	Satisfeito	Muito Satisfeito
2 (G4)	Até que ponto está satisfeito(a) com a sua saúde?	1	2	3	4	5

		Nada	Pouco	Nem muito nem pouco	Muito	Muitíssimo
3 (F1.4)	Em que medida as suas dores (físicas) o(a) impedem de fazer o que precisa de fazer?	1	2	3	4	5
4 (F11.3)	Em que medida precisa de cuidados médicos para fazer a sua vida diária?	1	2	3	4	5
5 (F4.1)	Até que ponto gosta da vida?	1	2	3	4	5
6 (F24.2)	Em que medida sente que a sua vida tem sentido?	1	2	3	4	5
7 (F5.3)	Até que ponto se consegue concentrar?	1	2	3	4	5
8 (F16.1)	Em que medida se sente em segurança no seu dia-a-dia?	1	2	3	4	5
9 (F22.1)	Em que medida é saudável o seu ambiente físico?	1	2	3	4	5

		Nada	Pouco	Moderadamente	Bastante	Completamente
10 (F2.1)	Tem energia suficiente para a sua vida diária?	1	2	3	4	5
11 (F7.1)	É capaz de aceitar a sua aparência física?	1	2	3	4	5
12 (F18.1)	Tem dinheiro suficiente para satisfazer as suas necessidades?	1	2	3	4	5
13 (F20.1)	Até que ponto tem fácil acesso às informações necessárias para organizar a sua vida diária?	1	2	3	4	5
14 (F21.1)	Em que medida tem oportunidade para realizar actividades de lazer?	1	2	3	4	5

		Muito Má	Má	Nem boa nem má	Boa	Muito Boa
15 (F9.1)	Como avaliaria a sua mobilidade [capacidade para se movimentar e deslocar por si próprio(a)]?	1	2	3	4	5

		Muito Insatisfeito	Insatisfeito	Nem satisfeito nem insatisfeito	Satisfeito	Muito Satisfeito
16 (F3.3)	Até que ponto está satisfeito(a) com o seu sono?	1	2	3	4	5
17 (F10.3)	Até que ponto está satisfeito(a) com a sua capacidade para desempenhar as actividades do seu dia-a-dia?	1	2	3	4	5
18 (F12.4)	Até que ponto está satisfeito(a) com a sua capacidade de trabalho?	1	2	3	4	5
19 (F6.3)	Até que ponto está satisfeito(a) consigo próprio(a)?	1	2	3	4	5
20 (F13.3)	Até que ponto está satisfeito(a) com as suas relações pessoais?	1	2	3	4	5
21 (F15.3)	Até que ponto está satisfeito(a) com a sua vida sexual?	1	2	3	4	5
22 (F14.4)	Até que ponto está satisfeito(a) com o apoio que recebe dos seus amigos?	1	2	3	4	5
23 (F17.3)	Até que ponto está satisfeito(a) com as condições do lugar em que vive?	1	2	3	4	5
24 (F19.3)	Até que ponto está satisfeito(a) com o acesso que tem aos serviços de saúde?	1	2	3	4	5
25 (F23.3)	Até que ponto está satisfeito(a) com os transportes que utiliza?	1	2	3	4	5

		Nunca	Poucas vezes	Algumas vezes	Frequentemente	Sempre
26 (F8.1)	Com que frequência tem sentimentos negativos, tais como tristeza, desespero, ansiedade ou depressão?	1	2	3	4	5

11. Questionário de Capacidades e Dificuldades

Instruções: Encontra a seguir 25 frases. Para cada uma delas marque, com uma cruz, um dos quadrados. Por favor, responda com base no comportamento do seu filho/a nos últimos **6 meses**.

	Não é verdade	É um pouco verdade	É muito verdade
1. É sensível aos sentimentos dos outros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. É irrequieto/a, muito mexido/a, nunca pára quieto/a	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Queixa-se frequentemente de dores de cabeça, dores barriga ou vômitos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Partilha facilmente com os outros adolescentes (as suas coisas, alimentos, etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Enerva-se muito facilmente e tem “crises de raiva”	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

6. Tem tendência a isolar-se, gosta mais de estar sozinho/a (sem amigos ou família)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Obedece com facilidade, faz habitualmente o que os adultos lhe mandam	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Tem muitas preocupações, parece sempre preocupado/a	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Gosta de ajudar se alguém está magoado, aborrecido ou doente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Não sossega. Está sempre a mexer as pernas ou as mãos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. Tem pelo menos um bom amigo/ uma boa amiga	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12. Luta frequentemente, ameaça ou intimida os outros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13. Anda muitas vezes triste, desanimado/a ou choroso/a	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14. Em geral os outros jovens gostam dele/a	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15. Distrai-se com facilidade, está sempre de cabeça no ar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
16. Em situações novas é receoso/a, muito agarrado/a e pouco seguro/a	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
17. É simpático/a e amável com as crianças mais pequenas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
18. Mentira frequentemente ou engana	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19. Os outros metem-se com ele/a, ameaçam-no/a ou intimidam-no/a	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
20. Sempre pronto/a a ajudar (pais, professores, outros adolescentes)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
21. Pensa nas coisas antes de as fazer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
22. Rouba em casa, na escola e em outros sítios	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
23. Dá-se melhor com os adultos do que com os adolescentes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
24. Tem muitos medos, assusta-se com facilidade	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
25. Geralmente acaba o que começa, tem uma boa atenção	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Fonte: Goodman, 2001

12. ANEXOS

Anexo 1



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

salivaTec - UCP
Laboratório de Investigação
Interdisciplinar em Saliva

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

INFORMAÇÃO AO DADOR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Título do projeto de investigação

Projeto de investigação que irá decorrer no SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa.

Objetivo do Estudo

A recolha de amostras biológicas humanas e seu posterior armazenamento no Biobanco de amostras do Instituto de Medicina Molecular (IMM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, permitirá a realização de investigação para o esclarecimento a nível molecular de doenças e para o desenvolvimento de diagnóstico e em múltiplas áreas da Saúde. Contudo, este objetivo só será cumprido com a colaboração dos doentes e de indivíduos saudáveis, através da doação de amostras biológicas que serão guardadas e preservadas em condições apropriadas de forma a serem utilizadas para futuros estudos. Caso o doente ou indivíduo saudável e/ou o seu representante legal decida participar, terá de fazer apenas os procedimentos habituais de uma consulta.

Procedimentos

No caso de concordar em participar neste projeto, ser-lhe-á colhida uma amostra biológica. A amostra habitualmente solicitada será realizada a partir da colheita de saliva. Para os indivíduos que estejam a realizar exames diagnósticos ou que estejam a ser sujeitos a tratamentos cirúrgicos poderá ser pedida autorização para colheita de uma pequena amostra do material removido durante o procedimento (como por exemplo tecidos removidos para biópsias ou removidos no decurso de cirurgias). Estas colheitas serão efetuadas sem alterar os procedimentos médicos habituais e sem interferir com a rentabilidade diagnóstica do procedimento ou com o sucesso da cirurgia. Esta amostra será preservada em condições apropriadas e as informações clínicas com ela relacionada serão introduzidas numa base de dados, passando a sua identificação pessoal a estar codificada e não acessível aos utilizadores das amostras.

A doação da amostra é voluntária e revogável, sendo que o dador, ou o seu representante legal, tem o direito de retirar a amostra e/ou interromper a colaboração assim que achar conveniente, sem necessidade de justificação e não podendo ser discriminado por isso. O dador ou o seu representante legal deverá manifestar por escrito a sua vontade em retirar a amostra ou interromper a colaboração e nestas situações a amostra será imediatamente destruída.

O SalivaTec propõe-se armazenar as amostras biológicas e seus possíveis derivados tais como DNA e RNA nas instalações do Biobanco do Instituto de Medicina Molecular. O SalivaTec não divulgará resultados envolvendo o material biológico. No entanto, o dador poderá escolher se quer ser informado dos resultados com potencial relevância para a sua saúde. O pedido de resultados deverá ser feito por

escrito para o SalivaTec pelo dador ou representante legal e deve ser expresso no consentimento informado.

Serão cumpridas todas as normas éticas aceites internacionalmente para o uso de matérias biológicas para fins de investigação. Todos os projetos que fizerem uso das amostras depositadas no Biobanco serão submetidos à Comissão de Ética competente para a sua avaliação.

Identificação das amostras e Confidencialidade

A existência de um Biobanco pressupõe a existência de uma base de dados contendo informação clínica referente ao doente ou indivíduo saudável. Após a colheita, as amostras serão identificadas por um código de forma a preservar a privacidade.

Durante o desenvolvimento de um projeto de investigação, a equipa de investigação poderá ter necessidade de recolher informação do processo clínico para a execução do estudo. O anonimato será, contudo mantido, ou seja os dados constantes do seu processo clínico serão fornecidos ao investigador, mas sem qualquer identificação, ou qualquer informação que permita saber a quem pertencem.

A descodificação apenas poderá ser efetuada pelo médico (que será o responsável pela base de dados, de acordo com a informação fornecida à Comissão Nacional de Proteção de Dados - CNPD), em caso de absoluta necessidade, por motivos de saúde do dador e, a pedido deste, e sempre de acordo com as disposições legais em vigor.

Os dados serão tratados confidencialmente, de acordo com a Lei, com os regulamentos e de acordo com as normas éticas aprovadas pela Comissão de Ética da Universidade Católica Portuguesa.

Os dados resultantes dos estudos realizados serão alvo de publicação de uma forma anónima e agregada, em termos de percentagens ou de dados numéricos, nunca individualmente.

Tempo de conservação

As amostras serão conservadas por um período de 20 anos no Biobanco do Instituto de Medicina Molecular (IMM), sob a responsabilidade da Equipa ligada ao SalivaTec, enquanto este estiver devidamente credenciado pelas entidades competentes. As coleções de amostras serão avaliadas periodicamente, nomeadamente para aferir da sua qualidade, podendo ser destruídas ou, findo o período da conservação, poder-se-á solicitar a prorrogação da conservação. Nestas condições excecionais o SalivaTec poderá voltar a contactar os dadores.

Comunicação e divulgação de dados

Os dados genéticos e as amostras biológicas colhidas para fins de investigação científica podem ser transferidos para outras organizações ou centros de investigação, para fins de pesquisa e somente em projetos desenvolvidos conjuntamente com o SalivaTec, mediante consentimento do participante expresso na declaração de consentimento informado.

Possíveis Benefícios para os Participantes

Esta é uma doação altruísta, não havendo por isso qualquer compensação para o dador. Não se garante que este estudo envolva quaisquer benefícios diretos para o participante. Se algum dos estudos puder ser relevante para a saúde do dador, este será informado, se essa for a sua vontade expressa na declaração de consentimento informado. Contudo, a sua participação proporcionará a aquisição de conhecimentos que poderão vir a beneficiá-lo a si ou a terceiros no futuro.

Riscos físicos previsíveis

Na maioria dos casos, os riscos e o desconforto associados serão mínimos ou inexistentes. Nas colheitas associadas a procedimentos com fins diagnósticos ou terapêuticos, os riscos e o desconforto serão os inerentes ao procedimento em si. Em qualquer dos casos, o dador será sempre antecipadamente informado dos riscos e grau de desconforto associados aos procedimentos.

Participação Voluntária e Direitos de Abandono

O presumível dador terá toda a liberdade para se recusar a participar no estudo ou retirar o seu consentimento, suspendendo a participação em qualquer momento e, conseqüentemente, as amostras serão destruídas. A participação é voluntária e a sua recusa em participar não envolverá qualquer penalização ou perda de benefícios. A recusa ou abandono não colocarão em risco o direito a receber tratamento ou assistência médica, presentemente ou no futuro.

O dador poderá retirar o seu consentimento nas modalidades **sem contacto futuro** (as amostras poderão ser usadas normalmente até se esgotarem, mas não serão estabelecidos futuros contactos para a obtenção de mais amostras) ou **sem uso futuro** (não serão estabelecidos futuros contactos e as amostras serão imediatamente destruídas e os registos eliminados).

Se tiver qualquer dúvida, em qualquer momento, mesmo após a colheita, sobre este estudo poderá contactar a Diretora do SalivaTec: Prof. Doutora Marlene Barros, dirigindo-se a:

SalivaTec
Departamento de Ciências da Saúde
Universidade Católica Portuguesa
Tel. +351232419500 - Fax +351232428344
E-mail: mbarros@crb.ucp.pt

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Banco de amostras biológicas para fins de investigação biomédica

Investigador: _____ Local de recolha: _____
Nome do dador: _____
Número de estudo do dador: _____

Eu, _____, portador do bilhete de identidade/cartão do cidadão n.º [_____], declaro ter tomado conhecimento e aceitar participar neste projeto, de forma a contribuir para a criação de um banco de amostras biológicas com informação clínica associada, para fins de investigação biomédica.

Aceito que a minha amostra biológica seja utilizada em projetos de investigação de mecanismos das doenças, diagnóstico precoce, fatores de prognóstico e novos alvos terapêuticos em múltiplas áreas da medicina. Poderei revogar a autorização para utilização da minha amostra biológica e informação clínica em qualquer altura. O objetivo do banco de amostras biológicas foi-me claramente explicado e foi-me dada a oportunidade de colocar questões sobre o seu funcionamento, bem como os procedimentos relativos à colheita e utilização da minha amostra biológica e dados a ela associados.

Declaro que aceito participar, voluntariamente, neste estudo. Especificamente concordo com os seguintes pontos:

- Consinto a colheita de material biológico (saliva / /) e autorizo a conservação de amostras no Biobanco, de modo a que possam ser usados para pesquisas futuras, incluindo estudos genéticos por investigadores portugueses e estrangeiros, sem fins lucrativos;

Sim Não

- **Esta opção é para ser respondida apenas por participantes que já cederam amostras biológicas colhidas no âmbito de outros projetos.** Nestas circunstâncias, autorizo a transferência para o Biobanco das minhas amostras biológicas, previamente colhidas no âmbito de outros projetos, de modo que elas possam ser utilizadas em pesquisas futuras, incluindo estudos genéticos por investigadores portugueses e estrangeiros, mas sem fins lucrativos;

Sim Não

- Estou consciente de que a minha participação é voluntária e que posso em qualquer altura solicitar a destruição das minhas amostras biológicas, invalidando assim o consentimento informado prévio, sem justificar, tendo recebido a garantia de que o meu pedido não desenvolverá discriminação;

Sim Não

- Declaro que quero conhecer resultados que possam ser relevantes para a minha saúde.

Sim Não

- Autorizo ser contactado novamente pelo Biobanco para pedido de atualização sobre a minha situação clínica;

Sim Não

- Autorizo o contactado do Biobanco a familiares meus para pedido autorização de colheita de amostras biológicas e/ou informação clínica;

Sim Não

Data

Assinatura do Dador/Representante Legal

Em caso de representante legal, este atua na qualidade de:

- Titular do poder paternal, quando o dador é menor
- Tutor, quando o dador foi declarado interdito
- Herdeiro, quando o dador faleceu

Discuti este estudo de investigação com o participante e/ou o seu representante legal, utilizando uma linguagem compreensível e apropriada. Informei adequadamente o participante sobre a natureza deste estudo e sobre os seus possíveis benefícios e riscos, considerando que o participante compreendeu a minha explicação.

Data

Nome do Investigador/ Médico

Assinatura do Investigador/ Médico

Foi entregue um duplicado deste documento ao doente/representante legal.

ANEXO 2

Protocolo de colheita de saliva

Nota: Usar sempre luvas ao lidar com secreções biológicas!

Material para a colheita



- ✓ *Cotton rol* (rolos de algodão que utilizam na clínica dentária para manter a zona de intervenção seca)
- ✓ Pinça estéril
- ✓ Tubo Falcon de 15 mL estéril e devidamente etiquetado, contendo uma ponta de micropipeta P100 a servir de suporte aos rolos de algodão. (Como o falcon é sujeito a centrifugação, a saliva passará para o fundo do tubo e os rolos de algodão podem ser removidos com facilidade pois mantém-se no topo da ponta de micropipeta.)
- ✓ Pontas de micropipetas P100
- ✓ Arca frigorífica para acondicionar as amostras (necessária nas saídas de campo)

Método de recolha

1. As amostras devem ser recolhidas aproximadamente à mesma hora (de preferência entre as 8h e as 10h da manhã)

Nota: De preferência os dadores não devem comer, beber ou ter qualquer procedimento de higiene oral pelo menos 1 hora antes da colheita de saliva.

2. Os dadores devem bochechar vigorosamente a boca com água antes da colheita durante 30 segundos
3. Após o processo de bochechar, esperar 1 minuto sem engolir (para voltar ao conforto) e colocar 2 rolos de algodão estéreis na boca do dador.
4. Quando os rolos estiverem embebidos em saliva (aproximadamente 2 minutos), recolhem-se com uma pinça estéril e colocam-se num tubo de falcon de 15 mL.

Nota: O tubo deve ter o fundo preenchido com uma ponta de micropipetas de 100 μL de modo a facilitar a recuperação posterior de saliva após centrifugação.

5. Caso a recolha seja realizada longe do laboratório, os tubos devem ser imediatamente armazenados no frio (arca refrigeradora) e posteriormente processados de acordo com os pontos seguintes.
6. Caso a recolha seja realizada perto do laboratório (p.ex. na clínica da UCP), os tubos devem ser imediatamente centrifugados a 10000xg durante 10 minutos a 4 °C.
7. De seguida retiram-se os rolos de algodão dos tubos com uma pinça esterilizada e com uma micropipeta P100 retiram-se as pontas, recolhendo a saliva que se encontra no fundo do tubo de 15 mL para um outro tubo de 15 mL devidamente etiquetado.

Nota: os tubos devem ser mantidos num recipiente com gelo.

8. Repete-se o procedimento até se ter recolhido toda a saliva.
9. Vortexar para homogeneizar a amostra e distribuir em alíquotas de 50 μL .

Congelar as amostras a -80°C.

ANEXO 3 – Tabela de Picos de Fluorescência com correspondência aos pesos moleculares (kDa)

Código Amostra	Grupo Estudo	Picos de Fluorescência (p) correspondentes ao peso molecular (kDa) aproximado																	
		p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p8	p9	p10	p11	p12	p13	p14	p15	p16	p17	p18
D00097	(P)	9,57	11,81	13,1 6	16	19,1 5	28,2	34,6 8	44,8 2	61,7	70,1 9	76,92	260	x	x	x	x	x	x
D00060	(G)	9,68	13,34	14,6 7	16,2 9	22,5 8	28,1 3	35,5	47,6 2	76,7 8	91,1 8	98,93	136,1 5	190,15 4	222,6 8	234,5 1	237,0 9	260	x
D00105	(S)	9,69	13,32	16,4 4	29,8 3	35,1 5	44,9 9	49,0 7	63,8 5	72,1 2	79,2 1	143,6 9	156,6 4		166,0 3	170,1 4	203,6 2	227, 11	260

ANEXO 4 – Tabela de Pesos Moleculares e Respectivas proteínas.

Mol. Wt. (kDa)	UniProt Code	Protein Name	Rosa N. et al (2013)	Identified in whole saliva	Biological Regulation	Cellular Component Organization or Biogenesis	Cellular Process	Develop. Process	Immune System Process	Loc.	Metab. Proc.	Multicellular Organismal Process	Reproduction	Response to stimulus
161	A8K2U0	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1	x	x	x		x		x		x			x
118	P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	x	x			x			x	x			
103	P55786	Puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)	x	x							x			
86	P06396	Gelsolin (AGEL)	x	x		x	x	x						
83	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor (PIgR)	x	x					x	x				x
80	P22079	Lactoperoxidase (LPO)	x	x					x		x			x
78	P02788	Lactotransferrin (Lactoferrin)	x	x						x	x			
77	Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	x	x							x			
77	Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	x	x							x			
69	P02768	Serum albumin	x	x						x				
69	P15311	Ezrin (Cytovillin)	x	x		x	x	x						
58	P14618	Pyruvate kinase PKM	x	x							x			
58	P04745	Alpha-amylase 1	x	X							x			
57	P07237	Protein disulfide-isomerase (PDI)	x	x							x			

Mol. Wt. (kDa)	UniProt Code	Protein Name	Rosa N. et al (2013)	Identified in whole saliva	Biological Regulation	Cellular Component Organization or Biogenesis	Cellular Process	Develop. Process	Immune System Process	Loc.	Metab. Proc.	Multicellular Organismal Process	Reproduction	Response to stimulus
54	Q9UBG3	Cornulin	x	x			x		x		x			
53	P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase	x	x							x			
50	P80303	Nucleobindin-2	x	x	x									
49	P01871	Ig mu chain C region	x	x					x					
49	Q8N4F0	BPI fold-containing family B member 2	x	x					x	x	x			x
47	P01009	Alpha-1-antitrypsin	x	x	x						x			
44	Q9UIV8	Serpin B13	x	x	x						x			
43	P30740	Leukocyte elastase inhibitor (LEI)	x	x	x						x			
39	P04083	Annexin A1	x	x			x				x			
38	P01876	Ig alpha-1 chain C region	x	x					x					
38	Q6P5S2	Protein LEG1 homolog *	x	x										
37	P00338	L-lactate dehydrogenase A chain (LDH-A)	x	x							x			
37	P01877	Ig alpha-2 chain C region	x	x										
36	P01857	Ig gamma-1 chain C region	x	x										
36	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	x	x							x			
35	P23280	Carbonic anhydrase 6	x	x							x			
34	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein (Zn-alpha-2-GP)	x	x					x					x

Mol. Wt. (kDa)	UniProt Code	Protein Name	Rosa N. et al (2013)	Identified in whole saliva	Biological Regulation	Cellular Component Organization or Biogenesis	Cellular Process	Develop. Process	Immune System Process	Loc.	Metab. Proc.	Multicellular Organismal Process	Reproduction	Response to stimulus
29	P06870	Kallikrein-1	x	x			x		x		x		x	x
28	P31947	14-3-3 protein sigma	x	x			x							
27	Q96DR5	BPI fold-containing family A member 2	x	x					x	x	x			x
23	P09211	Glutathione S-transferase P	x	x							x			
23	P04792	Heat shock protein beta-1 (HspB1)	x	x					x		x	x		x
23	Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B	x	x										
20	P18510	Interleukin-1 receptor antagonist protein (IL-1RN)	x	x			x		x					x
18	P01591	Immunoglobulin J chain	x	x					x					
18	Q9UHA7	Interleukin-36 alpha	x	x			x		x					x
18	Q9UBC9	Small proline-rich protein 3 *	x	x										
17	P27482	Calmodulin-like protein 3	x	x			x							
17	P12273	Prolactin-inducible protein	x	x					x					
17	P12273	Prolactin-inducible protein	x	x					x					
17	P02810	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 *	x	x										
16	P09228	Cystatin-SA (Cystatin-2)	x	x	x						x			
16	P01037	Cystatin-SN (Cystatin-SA-I)	x	x	x						x			

Mol. Wt. (kDa)	UniProt Code	Protein Name	Rosa N. et al (2013)	Identified in whole saliva	Biological Regulation	Cellular Component Organization or Biogenesis	Cellular Process	Develop. Process	Immune System Process	Loc.	Metab. Proc.	Multicellular Organismal Process	Reproduction	Response to stimulus
16	P01036	Cystatin-S (Cystatin-4)	x	x	x						x			
16	P01034	Cystatin-C (Cystatin-3)	x	x	x						x			
15	P07737	Profilin-1	x	x	x									
15	Q01469	Fatty acid-binding protein	x	x			x	x		x	x			
13	P06702	Protein S100-A9 (Calgranulin-B)	x	x			x		x		x			
11	P01040	Cystatin-A (Cystatin-AS)	x	x	x						x			
11	P05109	Protein S100-A8 (Calgranulin-A)	x	x			x		x		x			
10	P07108	Acyl-CoA-binding protein (ACBP)	x	x	x					x	x			
8	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B (Proline-rich peptide P-B) *	x	x										
7	P15515	Histatin-1 (Histidine-rich protein 1) *	x	x										