

Saliva, fluido fisiológico relevante na atual classificação das doenças periodontais?

Marta Filipa Silva Mesquita

Dissertação conducente ao Grau de Mestre em Medicina Dentária
(Ciclo Integrado)

Gandra, 13 de Junho de 2022



CESPU

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



Marta Filipa Silva Mesquita

Dissertação conducente ao Grau de Mestre em Medicina Dentária
(Ciclo Integrado)

Saliva, fluido fisiológico relevante na atual classificação das doenças periodontais?

Trabalho realizado sob a Orientação de Professora Dra. Marta Relvas
e Co-orientadora Professora Dra. Alexandra Viana da Costa



CESPU

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Declaração de Integridade

Eu, acima identificado, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste trabalho, confirmo que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri a qualquer forma de falsificação de resultados ou à prática de plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria do trabalho intelectual pertencente a outrem, na sua totalidade ou em partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciadas ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.



CESPU

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Trabalhos científicos

Apresentação de trabalho científico sob a forma de Comunicação Oral intitulado de “Saliva: fluido fisiológico relevante na atual classificação das doenças periodontais?”, no âmbito das XXX Jornadas de Ciências Dentárias, que decorreram no dia 08 de Abril de 2022, no Centro de Congressos da Alfandega do Porto. (Anexo 1)



CESPU

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Agradecimentos

Aos meus queridos pais, agradeço muito por me terem dado a oportunidade de seguir este percurso. Por tantas vezes que me escutaram, acalmaram a alma e encorajaram a seguir em frente. Em vocês encontrei sempre a maior das forças e o melhor exemplo a seguir.

Ao meu irmão, o ombro amigo e o apoio incondicional em todos os meus passos. Caminharemos lado a lado a vida toda.

Aos meus avós, as estrelas mais brilhantes do céu, que eu acredito que brilharam muito por mim e para mim, todos os dias.

À restante família, agradeço todo o carinho, preocupação e força ao longo deste tempo.

Ao Luís, o meu companheiro desta viagem, toda a sua amizade, compreensão, ajuda, respeito e amor.

À Sara, que esteve sempre ao meu lado, pela sua verdadeira amizade e generosidade em todas as partilhas e por todo o seu apoio.

Às minhas amigas, Sara, Carolina, Caterina, Marta e Inês, a amizade, o carinho e todos os momentos felizes que passamos juntas, que vou guardar para sempre no coração.

A todos os professores que cruzaram o meu caminho, todas as partilha de conhecimentos e conselhos, que me enriqueceram como pessoa e futura profissional.

Agradeço especialmente às professoras que orientaram este projeto, Dra. Marta Relvas, Dra. Alexandra Costa e Dra. Maria Gonçalves, por toda a disponibilidade, compreensão, trabalho, dedicação e carinho com que sempre me trataram ao longo deste último ano.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

- Mahatma Gandhi -



CESPU

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Resumo

A doença periodontal é uma condição inflamatória induzida pelas bactérias do biofilme dentário, que desencadeiam um processo imune. No decorrer do processo inflamatório, há libertação de imunomediadores como IL-1 β , IL-17A, RANK-L e OPG que se encontram na saliva e abrem a possibilidade de predizer um diagnóstico rápido e pouco invasivo da periodontite. (1)

O nosso objetivo foi avaliar a concentração de IL-1 β , IL-17A, RANK-L e OPG em amostras de saliva e relacionar os resultados com a atual classificação das doenças periodontais.

Para o estudo selecionamos uma amostra de 68 indivíduos, incluindo saudáveis e com periodontite, com base na atual classificação em estádios I-IV. Nestes indivíduos, foi recolhida e tratada a saliva e posteriormente determinados os níveis de IL-1 β , IL-17A, RANK-L e OPG, usando o Kit Beads Multi-analyte Flow Assay da LegendPlex por citometria de fluxo.

A análise estatística fez-se com recurso aos testes de Kruskal-Wallis, Dunn, Bonferroni, Qui-quadrado e ANOVA.

A análise dos resultados mostrou, na saliva, valores mais elevados de IL-1 β , IL-17A e RANK-L no grupo de indivíduos com periodontite estadio III/IV comparativamente aos indivíduos com periodontite estadio I/II e saudáveis. Contudo, só o imunomediador RANK-L apresentou diferenças estatisticamente significativas entre grupo com periodontite III/IV e grupo saudável.

O imunomediador RANK-L poderá vir a ser considerado relevante no diagnóstico preditivo da periodontite nos diferentes estádios.

Palavras-chave: periodontite; atual classificação; saliva; imunomediadores; biomarcadores.



CESPU

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Abstract

Periodontal disease is an inflammatory condition induced by bacteria in the dental biofilm, which triggers an immune process. In the course of the inflammatory process, there is a release of immune mediators such as IL-1 β , IL-17A, RANK-L and OPG that are found in saliva and opens the possibility to predict a rapid and non-invasive diagnosis of periodontitis. (1)

Our aim was to evaluate the concentration of IL-1 β , IL-17A, RANK-L and OPG in saliva samples and relate the results to the current classification of periodontal diseases.

For the study we selected a sample of 68 subjects, including healthy subjects and subjects with periodontitis, based on the current classification of stages I-IV. These individuals had their saliva collected and treated, and then the levels of IL-1 β , IL-17A, RANK-L and OPG were determined using the LegendPlex Beads Multi-Analytical Flow Assay Kit by flow cytometry.

Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis, Dunn, Bonferroni, Chi-square and ANOVA tests.

The analysis of the results showed higher values of IL-1 β , IL-17A and RANK-L in saliva in the group of subjects with periodontitis stage III/IV compared to periodontitis stage I/II and healthy subjects. However, only the RANK-L immunomediator showed statistically significant differences between the group periodontitis stage III/IV and the healthy group.

The RANK-L immunomediator may possibly be considered relevant for the predictive diagnosis of periodontitis in different stages.

Keywords: periodontitis; current classification; saliva; immunomediators; biomarkers.



CESPU

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Índice geral

I.	INTRODUÇÃO.....	1
II.	OBJETIVO.....	3
III.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	4
	i. Seleção da amostra.....	4
	ii. Recolha e tratamento da saliva.....	5
	iii. Determinação dos níveis de imunomediadores.....	5
	iv. Análise estatística.....	5
IV.	RESULTADOS.....	7
	i. Caracterização demográfica dos indivíduos em estudo.....	7
	ii. Comparação dos itens celulares (IL-1 β , IL-17A, RANK-L e OPG) ao nível da saliva (S) entre os 3 grupos.....	11
	iii. Comparação dos parâmetros periodontais (PI, BOP, PPD e CAL) entre os grupos.....	12
V.	DISCUSSÃO.....	13
VI.	CONCLUSÃO.....	17
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
VIII.	ANEXOS.....	21



CESPU

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Índice de figuras

Figura 1- Gráfico da distribuição dos indivíduos da amostra selecionada por sexo.....	7
Figura 1- Gráfico da distribuição dos indivíduos da amostra selecionada por faixas etárias	7
Figura 2- Gráfico da distribuição dos indivíduos da amostra de acordo com a condição periodontal e a idade.....	9



CESPU

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Índice de tabela

Tabela 1- Tabela da distribuição dos indivíduos pelos 3 grupos, segundo o sexo e idade.....	8
Tabela 2- Tabela da distribuição dos indivíduos pelos 3 grupos, segundo os hábitos tabágicos e número de cigarros/dia.....	9
Tabela 3- Tabela da distribuição dos indivíduos pelos 3 grupos, segundo os hábitos de higiene oral e utilização de fio dentário.....	10
Tabela 4- Diferença dos itens celulares (OPG, IL-1 β , RANK-L e IL-17A) entre os grupos, ao nível saliva.....	11
Tabela 5- Parâmetros periodontais em indivíduos sem periodontite e com periodontite....	12



CESPU

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Lista de abreviaturas

Análise de variância – **ANOVA**;

Desvio padrão – **DP**;

Índice de placa- “Plaque index” – **PI**;

Índice de sangramento à sondagem- “Bleeding on probing”- **BoP**;

Instituto Universitário Ciências da Saúde - **IUCS**;

Interleucina 1beta - **IL-1 β** ;

Interleucina 17A – **IL- 17A**;

Intervalo interquartil – **IQR**;

Kruskall-Wallis – **H**;

Ligante do Recetor Ativador do Fator Nuclear kappa- β – **RANK-L**;

Osteoprotegerina – **OPG**;

Perda de aderência clínica – “Clinical Attachment Loss” – **CAL**;

Profundidade de sondagem - “Periodontal Pocket Depth” – **PPD**;

Programa Estatístico de Ciências Sociais -“Statistical Program for Social Sciences” – **IBM; SPSS**;

Recetor Ativador do Fator Nuclear kappa- β - **RANK**;

Significância – **p** ;



CESPU

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

I. Introdução

A doença periodontal é uma condição inflamatória crónica, induzida pelo complexo bacteriano presente no biofilme dentário. Num estadio inicial, denominado gengivite, os lipopolissacarídeos e toxinas presentes no biofilme dentário provocam uma estreita reação inflamatória que se manifesta por edema, rubor e sangramento das gengivas. (1) Este estado pode ser revertido com um regime de higiene oral apropriado. (2) No entanto, se este quadro clínico se mantiver, a inflamação não fica confinada somente à gengiva e espalha-se para os tecidos periodontais refletindo-se através da perda de integridade do periodonto, comprometimento da função dos dentes e eventualmente a perda dos mesmos, o qual se denomina de periodontite. (2,3)

A progressão da doença e a evolução da inflamação envolvem um conjunto de vias moleculares mútuas, com ativação de células de defesa, libertação de citocinas e imunomediadores. Deste modo, é plausível a presença de IL-1 β , IL-17A, RANK-L e OPG nos locais de inflamação. (4)

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória que participa na inflamação e no recrutamento de células, como neutrófilos, macrófagos e monócitos, posteriormente linfócitos T, cujas populações podem produzir IL-17 e acentuar o processo inflamatório. (5,6)

A IL-17A é uma citocina conhecida por colaborar rapidamente no processo inflamatório, promove o recrutamento de neutrófilos e tem potentes efeitos pró-osteoclastogénicos que contribuem para a patogénese da periodontite. (7,8) Se não houver reversibilidade da inflamação, o processo torna-se mais insidioso e acompanha-se por alterações ao nível do RANK-L e OPG.

O RANK-L promove a destruição óssea, quando se liga ao RANK na superfície dos precursores dos osteoclastos, estimulando a diferenciação osteoclástica e a inibição da apoptose dos osteoclastos. Como resistência à degradação óssea, os osteoblastos produzem OPG, um inibidor natural do ligante RANK que bloqueia a ligação do RANK/RANK-L impedindo a reabsorção óssea. Assim, num estado de periodontite é notório um aumento

crescente destas citocinas e imunomediadores, à exceção da OPG que se encontra diminuída por perder as suas capacidades de controlo da destruição óssea e da osteoblastogénese. (9)

Tradicionalmente o diagnóstico da doença periodontal é baseado em parâmetros clínicos como, profundidade de sondagem, perda de inserção clínica, sangramento à sondagem, mobilidade e perda óssea radiográfica, que refletem a gravidade da doença, mas não permitem uma avaliação prematura da atividade celular subjacente, o que limita o diagnóstico precoce da patologia. (10,11)

O propósito futurístico é rastrear um estado inicial de doença e interromper prematuramente a sua progressão. Assim, há um interesse crescente em utilizar os imunomediadores como biomarcadores para o diagnóstico e monitorização da doença periodontal.(5) Está evidenciado que os imunomediadores acima referidos abundam na saliva e se relacionam com parâmetros clínicos de periodontite.(12) A saliva é altamente versátil, de fácil recolha e não invasiva que permite que alguns mililitros deste exsudado sejam o suficiente para detetar a presença da inflamação e discriminar se estamos perante um estado inicial ou tardio da doença. (2,13)

Na atual classificação das doenças periodontais, a periodontite deixa de ser classificada somente como agressiva ou crónica e passa a refletir o grau de severidade da doença, diferenciando-a por estadios. Assim, estadio I corresponde a uma periodontite inicial; estadio II periodontite moderada; estadio III periodontite severa com perda adicional de dentes; estadio IV a uma periodontite avançada com extensa perda dentária e outros fatores de complexidade. (10,14)

Este estudo tem como objetivo avaliar o valor preditivo dos imunomediadores no diagnóstico precoce da periodontite. E pretende relacionar a presença dos biomarcadores com os diferentes momentos da doença, tendo como base, a atual classificação das doenças periodontais. (14)

II. Objetivo

Determinar a concentração de IL-1 β , IL-17A, RANK-L, OPG em amostras de saliva e relacionar a sua presença com os estadios de periodontite, definidos pela atual classificação das doenças periodontais, e uma possível identificação de biomarcador(es) precoces de periodontite.

III. Materiais e Métodos:

Este estudo decorreu na Clínica Universitária Filinto Batista, em Gandra, no período de Setembro de 2021 a Março de 2022. Foi inicialmente aceite pela comissão de ética do IUCS e todos os indivíduos incluídos no estudo assinaram um termo de consentimento informado, após uma breve explicação do trabalho. (Anexo 2)

i. Seleção da amostra

A seleção da amostra foi feita em dois momentos. Inicialmente foi realizado um questionário sociodemográfico, médico e de hábitos de higiene oral para conhecer o perfil do indivíduo e a sua história médica e médico-dentária. Definimos como critérios de inclusão os indivíduos serem maiores de idade e apresentarem um estado de saúde periodontal ou periodontite. Aplicamos os critérios de exclusão de, indivíduos com gengivite, indivíduos submetidos a um tratamento periodontal no ano anterior e/ou à toma de antibiótico no mês antecedente à recolha, indivíduos com doenças sistémicas, mulheres grávidas e/ou a amamentar.

Num segundo momento, foi realizado um exame clínico periodontal a cada indivíduo, que consistiu na determinação de: profundidade de sondagem (PS), perda de inserção clínica (CAL), índice de placa (IP) e índice de sangramento à sondagem (BOP) com recurso à sonda cp11 nas 6 faces dos dentes (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual). As perdas dentárias, mobilidade dentária e lesões inter-radiculares também foram registadas por dente. As perdas ósseas alveolares foram medidas através de radiografias peri-apicais. Todos estes parâmetros conduziram-nos a um diagnóstico periodontal. Os indivíduos foram classificados como saudáveis ou com periodontite estádios I, II, III, IV, tendo como suporte a atual classificação das doenças periodontais, definida no "World Workshop on The Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions" em 2017. (14)

ii. Recolha e tratamento da saliva

Cada indivíduo foi instruído a recolher no mínimo 2ml de saliva não estimulada, através do método de cuspir "*spit out*" (Asif S. et al., 2021) para um frasco estéril, que lhe foi previamente atribuído. (15) Era importante que a saliva estivesse desprovida de sangue, revelador de placa ou qualquer outra substância que pudesse interferir com a leitura dos imunomediadores. Após a recolha, os tubos foram armazenados em câmaras frigoríficas adequadas à temperatura de oitenta graus negativos (-80 °C). Posteriormente a saliva foi descongelada e centrifugada a 500xg por 10 minutos. No final, o sobrenadante foi recolhido e distribuído por eppendorfs estéreis e novamente congelados a oitenta graus negativos até à data de análise.

iii. Determinação dos níveis de imunomediadores

As amostras de saliva foram analisadas quantitativamente para IL-1 β , IL-17A, RANK-L e OPG, com recurso ao Kit Beads Multi-Analyte Flow Assay da LegendPlex por citometria de fluxo e executado segundo as instruções do fornecedor (Biolegend).

iv. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com recurso ao programa IBM SPSS (Statistical Program for Social Sciences), versão 28.0 para Windows.

A estatística descritiva foi expressa como média, desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil (IQR) para as variáveis quantitativas e como frequências e percentagens para as variáveis qualitativas. Os dados clínicos e bioquímicos foram inicialmente examinados quanto à normalidade com o teste de Shapiro-Wilk e, no caso de não atingirem a normalidade, as análises foram realizadas por métodos não paramétricos. Assim, alternámos entre análise paramétrica e não paramétrica.

O teste de Qui-quadrado foi utilizado para avaliar a associação entre as variáveis qualitativas (faixas etárias, sexo, hábitos tabágicos e hábitos de higiene oral) entre os três grupos em estudo.

O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para comparar a concentração de biomarcadores entre os diferentes grupos, seguido do teste de Dunn com correção de Bonferroni.

Para comparar os parâmetros periodontais entre os diferentes grupos utilizou-se a ANOVA seguida do teste de Bonferroni.

O nível de significância estatística utilizado foi $p \leq 0,05$.

IV. Resultados

i. Caracterização demográfica dos indivíduos em estudo

A amostra em estudo foi constituída por 68 indivíduos, dos quais 47 (69,1%) eram do sexo feminino e 21 (30,9%) do sexo masculino. (figura 1)

Distribuição dos indivíduos por sexo

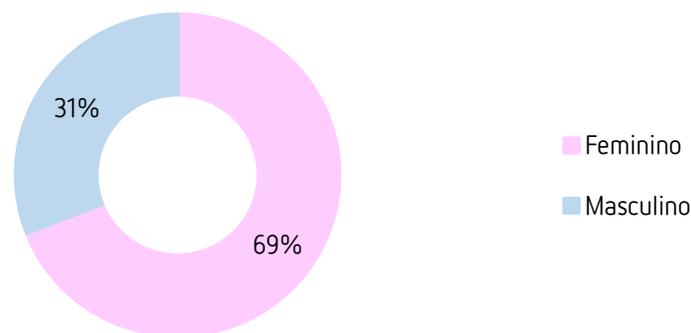


Figura 3- Gráfico da distribuição dos indivíduos da amostra selecionada por sexo

As idades dos indivíduos foram compreendidas entre os 19 e 76 anos (média=45,35; DP= 15,53), e quando organizados por faixas etárias obteve-se a seguinte distribuição: 11 (16,2%) dos indivíduos com idade menor ou igual a 25 anos, 21 indivíduos (30,9%) com idades compreendidas ente os 26 e 45 anos, inclusive, e 36 indivíduos (52,9%) com idade igual ou superior a 46 anos.

Distribuição da amostra por faixas etárias

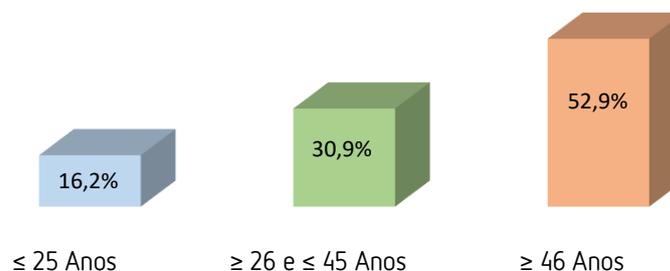


Figura 4 - Gráfico da distribuição dos indivíduos da amostra selecionada por faixas etárias

Dentro da nossa amostra e após aplicação da atual classificação, os indivíduos foram distribuídos por grupos da seguinte forma: 22 (32,4%) saudáveis, 17 (25%) com periodontite estadio I/II e 29 (42,6%) com periodontite estadio III/IV. As variações das idades por faixa etária e a distribuição por sexo nos 3 grupos, são detalhadas na tabela 1.

Tabela 1- Tabela da distribuição dos indivíduos pelos 3 grupos, segundo o sexo e idade

	Indivíduos do grupo saudáveis (n = 22)	Indivíduos com periodontite estadio I/II (n = 17)	Indivíduos com periodontite estadio III/IV (n = 29)	χ^2	p
Idade	32,27 ± 13,59	50,82 ± 12,64	52,07 ± 12,16		
≤ 25 Anos	10 (90,9%)	1 (9,1%)	0 (0%)		
≥ 26 Anos e ≤ 45 Anos	9 (42,9%)	3 (14,3%)	9 (42,9%)	28,75	<0,001
≥ 46 Anos	3 (8,3%)	13 (36,1%)	20 (55,6%)		
Sexo					
• Homem	3 (13,6%)	8 (47,1%)	10 (34,5%)	5,33	0,070
• Mulher	19 (86,4%)	9 (52,9%)	19 (65,5%)		

Dados apresentados como média ± desvio padrão ou frequências absolutas;

Verificou-se uma relação estatisticamente significativa entre a idade e a condição periodontal ($\chi^2(4) = 28,75; p < 0,001$), sendo que dos 36 indivíduos com idade superior a 46 anos, 20 (55,6%) apresentavam periodontite III/IV e 13 (36,1%) periodontite grau I/II. Dos 11 indivíduos com idade menor ou igual a 25 anos, apenas 1 apresentava periodontite I/II.

Por outro lado, não se verificou uma relação estatisticamente significativa entre o sexo e a condição periodontal.

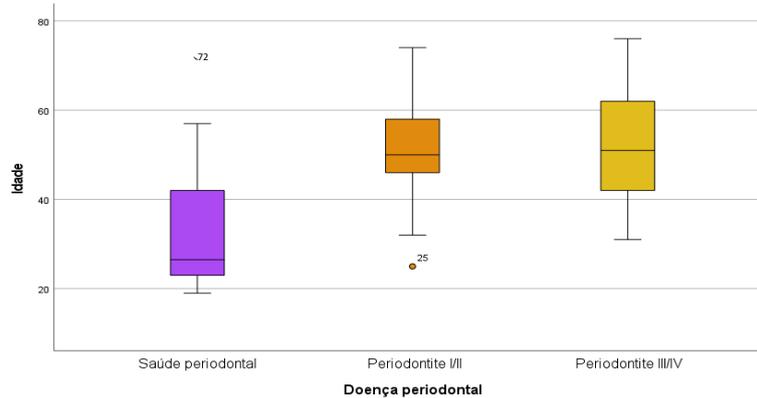


Figura 5- Gráfico da distribuição dos indivíduos da amostra de acordo com a condição periodontal e a idade

Relativamente aos fatores comportamentais modificadores ou de risco da doença, foram analisados os hábitos tabágicos da nossa amostra populacional e verificou-se que no total 46 (67,6%) eram não fumadores, 8 (11,8%) ex-fumadores e apenas 14 (20,6%) eram fumadores. Do total de fumadores, 6 (43%) fumavam menos de 10 cigarros por dia, 7 (50%) fumavam entre 10 a 20 cigarros por dia e apenas 1 (7%) fumava mais de 20 cigarros por dia. Através destes dados, verificou-se uma relação estatisticamente significativa entre os hábitos tabágicos e a condição periodontal ($\chi^2(4) = 9,54$; $p = 0,049$), visto que, do total de fumadores, 10 (71,4%) exibiram um estadio de periodontite III/IV. Para analisarmos pormenorizadamente este hábito nos grupos, temos a seguinte distribuição apresentada na tabela 2.

Tabela 2 - Tabela da distribuição dos indivíduos pelos 3 grupos, segundo os hábitos tabágicos e número de cigarros/dia

	Indivíduos do grupo saudáveis (n = 22)	Indivíduos com periodontite estadio I/II (n = 17)	Indivíduos com periodontite estadio III/IV (n = 29)	χ^2	p
Hábitos tabágicos					
Fumador	3 (21,4%)	1 (7,1%)	10 (71,4%)	9,54	0,049
Ex-Fumador	1 (12,5%)	2 (25,0%)	5 (62,5%)		
Não fumador	18 (39,1%)	14 (30,4%)	14 (30,4%)		
Nº Cigarros dia					
Menos 10 cigarros	2 (66,7%)	0	4 (40%)	1,91	0,752
Entre 10 a 20 cigarros	1 (33,3%)	1 (100%)	5 (50%)		
Mais de 20 cigarros	0	0	1 (10%)		

Quanto aos hábitos de higiene oral, a maioria dos indivíduos referiu escovar os dentes 2 vezes ao dia (42 indivíduos), seguindo-se os que referiram ter esse hábito três vezes ao dia (23 indivíduos). Quanto à utilização de meios auxiliares de higiene, o mais comum e uniformemente usado foi o fio dentário. No entanto, apenas 19 indivíduos referiram utilizar e 44 indivíduos não utilizavam, sendo que a sua maioria pertence ao grupo periodontite estadio III/IV.

Não se verificou uma relação estatisticamente significativa entre hábitos de higiene oral e o uso de fio dentário com a condição periodontal. Ainda que, os hábitos de higiene oral (frequência de escovagens e uso de fio dentário) estejam mais reduzidos nos indivíduos com periodontite em relação aos indivíduos saudáveis.

Tabela 3 - Tabela da distribuição dos indivíduos pelos 3 grupos, segundo os hábitos de higiene oral e utilização de fio dentário

	Indivíduos do grupo saudáveis (n = 22)	Indivíduos com periodontite estadio I/II (n = 17)	Indivíduos com periodontite estadio III/IV (n = 29)	χ^2	p
Hábitos higiene oral					
Escovagem 1 vez dia	0	0	3 (10,3%)	7,94	0,083
Escovagem 2 vezes dia	14 (63,6%)	8 (47,1%)	20 (69,0%)		
Escovagem 3 vezes dia	8 (36,4%)	9 (52,9%)	6 (20,7%)		
Uso de fio dentário					
Não	7 (31,8%)	13 (76,5%)	24 (82,8%)	9,79	0,86
Sim	12 (54,5%)	4 (23,5%)	3 (10,3%)		
Às vezes	3 (13,6%)	0	2 (6,9%)		

ii. **Comparação dos itens celulares (IL-1 β , IL-17A, RANK-L e OPG) ao nível da saliva (S) entre os 3 grupos**

O teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn com correção de Bonferroni (tabela 4) mostrou diferenças estatisticamente significativas ao nível do RANK-L na saliva ($H= 10,53$; $p=0.005$), entre o grupo saudável e o grupo com periodontite III/IV ($p= 0,004$), sendo que o grupo que apresentou valores mais elevados foi o grupo com periodontite III/IV e mais baixos o grupo saudável. No que diz respeito aos marcadores salivares IL-1 β e IL-17A, foram igualmente os pacientes com periodontite III/IV que apresentaram valores mais elevados, comparativamente com os pacientes com periodontite I/II e os pacientes saudáveis, todavia estas diferenças não atingiram o significado estatístico. Ao nível da deteção da OPG verificou-se, contrariamente ao esperado, valor superior no grupo pacientes com periodontite I/II relativamente ao grupo saudável e ao grupo periodontite III/IV.

Tabela 4 - Diferenças dos itens celulares (OPG, IL-1 β , RANK-L e IL-17A) entre os grupos, ao nível da saliva

	GRUPOS	N	Mean Rank	H	p	Valor de P para correção Bonferroni
OPG (pg/ml)	Saudável	22	35,68			
	Periodontite I/II	17	39,76	2,46	0,292	
	Periodontite III/IV	29	30,52			
IL-1β (pg/ml)	Saudável	22	29,11			
	Periodontite I/II	17	32,00	4,19	0,123	
	Periodontite III/IV	29	40,05			
RANK-L (pg/m)	Saudável*	22	24,18			
	Periodontite I/II	17	34,53	10,53	0,005	0,004
	Periodontite III/IV*	29	42,31			
IL-17A (pg/ml)	Saudável	22	29,55			
	Periodontite I/II	17	35,94	2,10	0,350	
	Periodontite III/IV	29	37,41			

$H=$ Kruskal-Wallis; $p=$ significância

iii. Comparação dos parâmetros periodontais (PI, BOP, PPD e CAL) entre os grupos

Na Tabela 5, pode-se verificar que existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de indivíduos saudáveis, indivíduos com periodontite I/II e periodontite III/IV, em função dos parâmetros periodontais. Estas diferenças estabeleceram-se sempre por comparação com os participantes do grupo periodontite III/IV. Estes apresentaram valores mais elevados em todos os parâmetros periodontais. No que diz respeito ao número de dentes, verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos saudável e periodontite III/IV e entre os grupos periodontite I/II e periodontite III/IV.

Tabela 5 – Parâmetros periodontais em indivíduos sem periodontite e com periodontite

Índices periodontais	H	M	S	gl	F	η^2	Em	H v/s	H v/s	M v/s
	(n = 22)	(n = 17)	(n = 29)				geral	M	S	S
							<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
PI%	19,27±12,33	41,82±18,13	65,21±26,01	265	31,52	0,492	<0,001	0,003	<0,001	0,001
BOP%	6,14 ± 4,89	23,71±14,79	47,05±28,23	265	26,37	0,448	<0,001	0,026	<0,001	<0,001
PPD Total	1,65 ± 0,25	2,5± 0,69	3,68± 1,16	265	36,90	0,532	<0,001	0,008	<0,001	<0,001
CAL Total	1,67± 0,26	2,83± 0,86	4,30± 1,27	265	48,90	0,601	<0,001	0,001	<0,001	<0,001
Número de Dentes	28,18± 2,02	26,41± 3,79	23,21± 5,34	265	9,45	0,225	<0,001	0,570	<0,001	0,041

H: indivíduos com saúde; M: doentes com doença periodontal I/II; S: doentes com doença periodontal III/IV M (SD) = Média (desvio padrão); F= Anova; dg= grau de liberdade; p= nível de significância; η^2 = tamanho do efeito da amostra. ANOVA com teste de Bonferroni.

V. Discussão

Neste estudo, o nosso objetivo foi o de avaliar a presença de imunomediadores relevantes da saliva e relaciona-los com características clínicas dentro da atual classificação das doenças periodontais. (14)

O nosso suporte bibliográfico de apoio à discussão, baseou-se, contudo, em artigos publicados com base na antiga classificação, pois os estudos comparativos dentro da atual classificação são por enquanto diminutos, mas numa fase de clara expansão.

Dadas as diferenças de respostas inter-individuais que existem, é notório que um único biomarcador não é o suficiente nem deliberativo para um diagnóstico correto de periodontite. (12) Está comprovado que a identificação de um conjunto de biomarcadores fornece informações mais robustas e completas sobre o estado da doença, porque o seu aparecimento ocorre em momentos distintos e caracteriza fases diferentes do processo imuno-inflamatório. (10,12)

Assim, a **IL-1 β** é uma citocina multifuncional presente na saliva, de alta especificidade e sensibilidade na deteção, e afigura-se como uma boa opção para distinguir estados de saúde ou de periodontite, (2,16) sendo neste momento o biomarcador mais estudado e com a mais eminente capacidade preditiva. (5) Em processos normais, a IL-1 β apresenta níveis pouco elevados na periodontite leve, contudo tendencialmente crescentes nos estadios de periodontite moderada e severa.(2)

No nosso estudo, a presença de IL-1 β foi superior nos grupos com periodontite III/IV e I/II comparativamente ao grupo saudável, demonstrando um aumento do nível desta citocina pró-inflamatória com a crescente severidade da doença periodontal, no entanto, sem significado estatístico. Sem uma explicação imediata, podemos propor como fator de influência o insuficiente tamanho da nossa amostra de indivíduos no estudo.

Contudo, a tendência de aumento do nível de IL-1 β na saliva com a progressão da periodontite é apoiada por vários artigos científicos, nomeadamente, de *Zhang et al. (2021)*, em que o grupo com periodontite apresentou valores significativamente mais elevados de IL-1 β em comparação com o grupo saudável (11). Já na revisão sistemática de *Kim J. et al. (2020)* é descrito que a IL-1 β na saliva é significativamente mais observada em pacientes

com periodontite em comparação com grupos saudáveis (2). Contudo, *Sánchez G. et al. (2013)* obtiveram níveis de IL-1 β superiores (com significância estatística) nos grupos de doentes com periodontite moderada e severa, mas não com periodontite ligeira. O que sugere que a fase evolutiva do processo inflamatório e o local de proveniência deste mediador, ou até a idade do paciente, podem contribuir como fatores de heterogeneidade. (17)

A **IL-17A** é uma citocina conhecida por participar na atividade inflamatória e que desempenha um papel importante na patogénese da periodontite. Por norma, no decorrer do processo inflamatório este imunomediador encontra-se em níveis elevados na periodontite.(7) Os nossos resultados relativamente a este imunomediador vão de encontro ao que é teoricamente definido, apresentando o seu maior valor no grupo de indivíduos de periodontite III/IV, no entanto sem apresentarem diferença estatisticamente significativa. Ao analisarmos a bibliografia encontramos alguns aspetos que introduzem variabilidade de resultados em relação ao papel da IL-17 na periodontite.

Assim, no estudo descritivo-analítico de *Vahabi S. et al. (2020)*, observaram concentração salivar de IL-17A mais baixa em pacientes com periodontite comparativamente com os grupos saudáveis. Contudo, a amostra em estudo era pequena, havia o fator idade em causa e ainda a sensibilidade do método de análise. (18) No entanto, também há muitas outras referências bibliográficas que demonstram, que na saliva, a IL-17A está associada a processos inflamatórios e a estados de periodontite, em que níveis de IL-17 estão significativamente mais elevados no decorrer do processo periodontal.(18,19) De forma geral, é sugerido que se façam estudos com amostras populacionais maiores e que se aprofunde o papel desta citocina no processo imuno-inflamatório da periodontite.

RANK-L é uma proteína produzida por várias células e responsável por controlar a regeneração e remodelação óssea. Na periodontite, com a progressão da inflamação o RANK-L é ativado e promove a formação e ativação de osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea. Isto significa que, quanto maior o grau de inflamação, maior é a quantidade de RANK-L circulante naquele lugar. (20) No nosso estudo, a concentração de RANK-L exibiu diferenças estatisticamente significativas entre o grupo saudável e o grupo com periodontite III/IV, apresentando este último, valores mais elevados e em concordância

com o descrito no estudo de *Belibasakis G. et al. (2012)*. (20) Na análise dos biomarcadores salivares descrita no artigo de *Teodorescu Ac. et al. (2019)*, também foi observada uma presença de RANK-L superior na periodontite generalizada agressiva e um valor inferior no grupo saudável. (9) De igual forma, os resultados do artigo de *Asif S. et al. (2021)* corroboram com os nossos resultados ao admitir que níveis altos de RANK-L foram encontrados em pacientes com doença periodontal moderada a grave em comparação com pacientes com doença periodontal leve e pacientes saudáveis (não periodontite). (15) Contudo, teria sido interessante, no nosso estudo ter encontrado valores de RANK-L no grupo com periodontite I/II já significativamente diferentes do grupo saudável, pois antecipava o valor preditivo do RANK-L como biomarcador.

Já a **OPG** é uma proteína produzida por células dos tecidos periodontais, regulada por uma série de citocinas inflamatórias e que desempenha um papel vital na inibição do recrutamento, ativação e diferenciação dos osteoclastos e, por isso na reabsorção óssea. Por norma, os seus níveis estão mais elevados num estado de saúde periodontal, o que significa que mantém as suas capacidades na osteoblastogénese. No entanto, num estado de periodontite, esta proteína deixa de evitar que todo o processo de degeneração óssea possa ocorrer, e por isso encontra-se em níveis diminuídos. (9)

No nosso estudo, houve uma concentração superior de OPG no grupo saudável quando comparado com o estadio de periodontite III/IV e ligeiramente menor no grupo saudável em relação ao grupo periodontite I/II, fenómeno que podemos associar para já, ao facto da amostra não ter sido o suficientemente grande para evidenciar as diferenças estatísticas, ou ainda à dinâmica de produção de RANK-L e OPG no decurso da inflamação.

Contudo, na literatura vários são os artigos que se evidenciam contraditórios. Ao analisarmos outros estudos, temos que, no artigo de *Teodorescu Ac. et al. (2019)*, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos. (9) No entanto, no estudo de *Asif S. et al. (2021)* houve níveis mais elevados de OPG no grupo com periodontite grave em contraste com o grupo saudável, justificado pelo facto de o hábito de fumar e a idade dos pacientes serem fatores de variabilidade e, portanto, terem influência significativa na interpretação dos dados e nos resultados de análise da OPG. Este estudo salienta igualmente a importância da inter-relação significativa entre os parâmetros

clínicos e a idade, simultaneamente com valores mais baixos de OPG e valores mais altos de RANK-L observados entre os pacientes mais velhos.(15)

Quando comparamos os parâmetros periodontais (PI, BOP, PPD e CAL) entre os três grupos, pode-se verificar que existem diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos saudáveis, indivíduos com periodontite I/II e periodontite III/IV. Os valores são tendencialmente crescentes para todos os parâmetros clínicos, mas nos parâmetros índice de placa (PI) e índice de sangramento à sondagem (BOP) é considerável o aumento entre os grupos que representam a evolução da doença. No artigo de *Teodorescu Ac. et al. (2019)* quando se fez comparação do índice BOP, este foi significativamente maior nos grupos de periodontite quando comparados com o grupo saudável.(9) O mesmo foi descrito no estudo experimental de *Zhang Y. et al. (2021)* em que, os grupos com periodontite apresentaram PI e BOP mais elevados. (11)

Relativamente ao hábito tabágico, é evidente que fumar tem um efeito direto e adverso sobre os tecidos periodontais de suporte, aumentando o risco de periodontite em 2 a 5 vezes segundo a atual classificação das doenças periodontais. Não há características fenotípicas periodontais únicas em pacientes fumadores, no entanto, o tabagismo é um importante fator modificador da periodontite e deve ser tido em conta no momento do diagnóstico clínico.(21)

No nosso estudo, verificou-se que no grupo periodontite III/IV se encontrou a maior percentagem de indivíduos fumadores e no grupo saudável a maior percentagem de indivíduos não fumadores. Foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre o hábito tabágico e a doença periodontal, que se traduziu por uma maior predisposição dos fumadores para a periodontite, tal como descrito na literatura. (21, 22)

VI. Conclusão

A análise dos nossos resultados revelou que valores mais elevados de IL-1 β , IL-17A e RANK-L foram associados a indivíduos com periodontite estadio III/IV comparativamente aos indivíduos com periodontite estadio I/II e saudáveis. Entre todos, o imunomediador RANK-L foi considerado o biomarcador da saliva mais conveniente no diagnóstico da periodontite na atual classificação.

De facto existem muitos estudos publicados que descrevem a associação entre a presença dos imunomediadores com estadios de periodontite agressiva e crónica, mas menos frequentes os que fazem referência aos estadios de periodontite propostos pela atual classificação.

Com este estudo, percebe-se que há uma relação evidente entre a presença dos biomarcadores salivares e os estadios atuais de periodontite, e por tal, que estes poderão ser úteis e exequíveis para diagnóstico da doença.

Sendo este tema ainda controverso, é suficientemente desafiador, para dar continuidade a estudos mais alargados e esclarecedores no âmbito da atual classificação das doenças periodontais.

VII. Referências bibliográficas

1. Lundmark A, Hu YOO, Huss M, Johannsen G, Andersson AF, Yucel-Lindberg T. Identification of salivary microbiota and its association with host inflammatory mediators in periodontitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019 Jun 9.
2. Kim JY, Kim HN. Changes in inflammatory cytokines in saliva after non-surgical periodontal therapy: A systematic review and meta-analysis. Vol. 18, *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG; 2020. p. 1–16.
3. Taylor JJ. Protein Biomarkers of Periodontitis in Saliva. *ISRN Inflammation*. 2014 Apr 22;1–18.
4. Fatemi K, Rezaee SA, Banihashem SA, Keyvanfar S, Eslami M. Importance of MMP-8 in Salivary and Gingival Crevicular Fluids of Periodontitis Patients. *Iran J Immunol*. 2020 Sep 1;17(3):236–43.
5. Cafiero C, Spagnuolo G, Marenzi G, Martuscelli R, Colamaio M, Leuci S. Predictive periodontitis: The most promising salivary biomarkers for early diagnosis of periodontitis. Vol. 10, *Journal of Clinical Medicine*. MDPI; 2021.
6. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003;74(3):391–401
7. Zenobia C, Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol 2000*. 2015 Oct 1;69(1):142–59.
8. Ramadan DE, Hariyani N, Indrawati R, Ridwan RD, Diyatri I. Cytokines and Chemokines in Periodontitis. Vol. 14, *European Journal of Dentistry*. Georg Thieme Verlag; 2020. p. 483–95.
9. Teodorescu AC, Martu I, Teslaru S, Kappenberg-Nitescu DC, Goriuc A, Luchian I, et al. Assessment of Salivary Levels of RANKL and OPG in Aggressive versus Chronic Periodontitis. *Journal of Immunology Research*. 2019.
10. Lee J, Lee JB, Song HY, Son MJ, Li L, Rhyu IC, et al. Diagnostic models for screening of periodontitis with inflammatory mediators and microbial profiles in Saliva. *Diagnostics*. 2020 Oct 14;10.
11. Zhang Y, Kang N, Xue F, Qiao J, Duan J, Chen F, et al. Evaluation of salivary biomarkers for the diagnosis of periodontitis. *BMC Oral Health*. 2021 Dec 1;21 (1).

12. Ji S, Choi Y. Point-of-care diagnosis of periodontitis using saliva: Technically feasible but still a challenge. Vol. 5, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2015.
13. Melguizo-Rodríguez L, Costela-Ruiz VJ, Manzano-Moreno FJ, Ruiz C, Illescas-Montes R. Salivary biomarkers and their application in the diagnosis and monitoring of the most common oral pathologies. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–17.
14. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018 Jun 1;89:S159–72.
15. Asif S, Ahmad B, Hamza SA, Taib H, Kassim NK, Zainuddin SLA. Investigation of Salivary RANKL and OPG Levels in Periodontitis Patients at Hospital Universiti Sains Malaysia. *European Journal of Dentistry*. 2021;
16. Kim JY, Kim KR, Kim HN. The potential impact of salivary IL-1 on the diagnosis of periodontal disease: A pilot study. *Healthcare (Switzerland)*. 2021 Jun 1;9(6).
17. Sánchez GA, Miozza VA, Delgado A, Busch L. Salivary IL-1 β and PGE2 as biomarkers of periodontal status, before and after periodontal treatment. *Journal of Clinical Periodontology*. 2013 Dec;40(12):1112–7.
18. Vahabi S, Yadegari Z, Pournaghi S. The comparison of the salivary concentration of interleukin-17 and interleukin-18 in patients with chronic periodontitis and healthy individuals [Internet]. Vol. 280, *Dental Research Journal*. 2020.
19. Batool H, Nadeem A, Kashif M, Shahzad F, Tahir R, Afzal N. Salivary Levels of IL-6 and IL-17 Could Be an Indicator of Disease Severity in Patients with Calculus Associated Chronic Periodontitis. *BioMed Research International*. 2018.
20. Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. Vol. 39, *Journal of Clinical Periodontology*. 2012. p. 239–48.
21. Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P, Cortellini P, et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018 Jun 1;89:S237–48.

22. Jiao J, Jing W, Si Y, Feng X, Tai B, Hu D, et al. The prevalence and severity of periodontal disease in Mainland China: Data from the Fourth National Oral Health Survey (2015-2016). *J Clin Periodontol*. 2021 Feb 1;48(2):168–79.

VIII. ANEXOS

Anexo I - Diploma de apresentação de trabalho científico sobre a forma de Comunicação Oral, nas XXX Jornadas de Ciências Dentárias, que tiveram lugar no dia 08 de Abril de 2022, no Centro de Congressos da Alfândega do Porto. (Anexo 1)



Anexo II - Parecer da comissão de ética do IUCS relativo ao projeto de investigação "*Analysis of inflammatory mediators in the new classification of periodontal diseases*" para realização deste projeto.



Exma. Senhora Investigadora
Prof. Doutora Marta Mendonça Moutinho Relvas

N/Ref.º: CE/IUICS/CESPU-08/21

Data: 2021/abril/09

Assunto: - Parecer relativo ao Projeto de Investigação: 9/CE-IUICS/2021
- **Título do Projeto:** *Analysis of inflammatory mediators in the new classification of periodontal diseases*
- **Investigador responsável:** Prof. Doutora Marta Mendonça Moutinho Relvas

Exma. Senhora,

Informo V. Exa. que o projeto supracitado foi analisado na reunião da Comissão de Ética do IUCS, da CESPU, Cri, no dia 08/04/2021.

A Comissão de Ética emitiu um parecer favorável à realização do projeto tal como apresentado.

Com os melhores cumprimentos,

Rua Central de Gandra, 1317
4585-116 GANDRA PRD • Portugal
T: +351 224157100 • F: +351 224157101
www.cespu.pt

Prof. Doutor José Carlos Márcia Andrade
Presidente da Comissão de Ética do IUCS



CESPU - INSTITUTO UNIVERSITÁRIO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
(ANTIGOR INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - NORTE)
DENOMINAÇÃO E RECONHECIMENTO DE INTERESSE PÚBLICO ALTERADOS PELO DECRETO-LEI Nº 57/2015, DE 20-04
RUA CENTRAL DE GANDRA, 1317 - 4585-116 - GANDRA PRD - T: +351 224 157 100 - F: +351 224 157 101
CESPU - COOPERATIVA DE ENSINO SUPERIOR, POLITÉCNICO E UNIVERSITÁRIO, CR.
CONTIC: 501 577 840 - CAP. SOCIAL: 1.250.000,00 EUR - MAT. CONT. R. C. PORTO Nº 216 - WWW.CESPU.PT