



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Artigo de Revisão Bibliográfica

“Proteómica do Fluido Crevicular Gengival: Uma Revisão sobre biomarcadores nas doenças periodontais”

“Gingival Crevicular Fluid Proteomics: A Review on Periodontal Disease Biomarkers”

Marcelo Cavalcante Marinho

**Mestrado Integrado em Medicina Dentária
Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto**

Porto, 2024



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

“Proteómica do Fluido Crevicular Gengival: Uma Revisão sobre biomarcadores nas doenças periodontais”

“Gingival Crevicular Fluid Proteomics: A Review on Periodontal Disease Biomarkers”

Área científica: Periodontologia

Autor: Marcelo Cavalcante Marinho

Orientador:

Prof. Ricardo Manuel Casaleiro Lobo de Faria e Almeida

Professor Catedrático da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Coorientador:

Honorato José Ribeiro Vidal

Professor Auxiliar Convidado da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

RESUMO

Os métodos de avaliação clínica e radiográfica para diagnóstico de doenças periodontais apresentam grandes limitações em prever a perda de inserção. Com isso, existe a necessidade de desenvolvimento de metodologias mais rápidas e eficazes, mas cientificamente comprovada para a aplicação clínica diária. O fluido crevicular gengival é rico em proteínas derivadas de células hospedeiras e microrganismos, representando o meio mais adequado de se aproximar da fisiologia gengival. Os potenciais biomarcadores presentes nesse fluido conseguem ser detetados com tecnologia proteômica e proporcionam um meio promissor para a detecção precoce e a monitoração da progressão das doenças periodontais. A presente revisão da literatura foca-se na análise proteômica, a utilizar espectrometria de massa para investigar as proteínas presentes no fluido crevicular gengival. Diversas estratégias analíticas foram analisadas com foco na procura por biomarcadores. Os resultados apontam para a presença de múltiplas proteínas no fluido crevicular gengival, que variam significativamente entre indivíduos saudáveis e aqueles com periodontite, destacando o papel da inflamação, do metabolismo lipídico e da resposta imune na patogênese das doenças periodontais. As proteínas identificadas estão associadas a processos biológicos chave, como a resposta inflamatória e a regulação do metabolismo, sugerindo que alterações no perfil proteômico do fluido crevicular gengival podem servir como indicadores precoces da doença periodontal. Em conclusão, o potencial das abordagens ômicas com fluido crevicular gengival para o diagnóstico e acompanhamento das doenças periodontais é indiscutível. O presente estudo estabelece uma base para futuras investigações que podem levar ao desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas personalizadas para o tratamento das doenças periodontais, enfatizando a importância de avanços tecnológicos na análise proteômica e bioinformática para superar os desafios metodológicos atuais.

Palavras-chave: Fluido crevicular gengival, fluido gengival, espectrometria de massa, proteômica, peptodômica, metaproteômica

ABSTRACT

Clinical and radiographic assessment methods for diagnosing periodontal diseases have significant limitations in predicting attachment loss. Therefore, there is a need to develop faster and more effective methodologies that are scientifically proven for daily clinical application. Gingival crevicular fluid is rich in proteins derived from host cells and microorganisms, representing the most suitable medium to approach gingival physiology. Potential biomarkers present in this fluid can be accessed through proteomic technology and provide a promising means for early detection and monitoring of periodontal diseases. The current literature review focuses on proteomic analysis, using mass spectrometry to investigate proteins present in gingival crevicular fluid. Various analytical strategies have been reviewed with a focus on biomarker discovery. The results indicate the presence of multiple proteins in gingival crevicular fluid, which vary significantly between healthy individuals and those with periodontitis, highlighting the role of inflammation, lipid metabolism, and immune response in the pathogenesis of periodontal diseases. The identified proteins are associated with key biological processes such as inflammatory response and metabolism regulation, suggesting that changes in the proteomic profile of gingival crevicular fluid may serve as early indicators of periodontal disease. In conclusion, the potential of omics approaches with gingival crevicular fluid for diagnosing and monitoring periodontal diseases is undeniable. This study establishes a foundation for future research that may lead to the development of new diagnostic and personalized therapeutic strategies for the treatment of periodontal diseases, emphasizing the importance of technological advances in proteomic analysis and bioinformatics to overcome current methodological challenges.

Keywords: Gingival crevicular fluid, gingival fluid, mass spectrometry, proteomics, peptidomics, metaproteomics

LISTA DE ABREVIATURAS

A1AGP – Glicoproteína alfa-1-ácida

CP – Periodontite crônica

DEFA-1 – Alfa-defensina 1

DM2 – *Diabetes mellitus* tipo 2

Gal-10 – Galectina-10

GCF – Fluido crevicular gengival

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

LCN2 - Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos

MALDI-TOF – Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight

MILP – Modelagem de otimização linear mista inteira

MMP – Metaloproteinase de matriz

MS – Espectrometria de massa

PTMs – Modificações pós-traducionais

ÍNDICE

RESUMO.....	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAS E MÉTODOS	3
3. RESULTADOS.....	3
4. DESENVOLVIMENTO	17
4.1 Desafios analíticos e pré-analíticos.....	17
4.2 Preparação de amostras para espectrometria de massas (MS)	18
4.3 Proteómica / abordagem <i>bottom-up</i>	19
4.4 Peptidómica / abordagem <i>top-down</i>	28
4.5 Metaproteómica.....	32
4.6 Desafios e prospeções futuras	34
5. CONCLUSÃO	35

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma das condições bucais mais prevalentes globalmente, afetando significativamente a qualidade de vida (1). Caracterizada por uma resposta inflamatória crônica aos agentes patogênicos presentes no biofilme dental, a progressão da doença periodontal pode levar a perda dentária e tem sido associada a várias condições sistêmicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e partos prematuros (2). A natureza multifatorial da doença periodontal, juntamente com sua variabilidade individual na progressão e resposta ao tratamento, evidencia a necessidade urgente de biomarcadores confiáveis para sua detecção precoce, monitorização da progressão da doença e personalização das intervenções terapêuticas.

A análise proteômica do fluido crevicular gengival (GCF) tem emergido como uma ferramenta promissora na busca por biomarcadores e na compreensão das condições periodontais (3). Composto por elementos celulares, compostos orgânicos e inorgânicos, enzimas e produtos bacterianos, este fluido oferece uma janela única para a investigação do microambiente periodontal (4). A utilização de técnicas avançadas como a espectrometria de massa (MS) abre caminho para a análise abrangente de amostras biológicas complexas como o GCF.

A pesquisa em proteômica do GCF tem utilizado avançadas técnicas analíticas, como a cromatografia líquida acoplada à MS (LC-MS/MS), para caracterizar o mapa de proteínas em saúde e doença. Estudos têm revelado a presença de enzimas proteolíticas, citocinas, fatores de crescimento e outras moléculas reguladoras que desempenham papéis cruciais na inflamação, degradação tecidual e resposta imune local (4). As diferentes abordagens proteômicas/peptidômicas, bottom-up e top-down, surgiram na tentativa de detectar as proteínas do GCF no estado mais inalterado para compreender a complexidade de interações que acontecem entre as células do hospedeiro e a microbiota (5). Além disso, análise proteômica do GCF enfrenta vários desafios metodológicos, incluindo a variação na coleta de amostras, a complexidade e baixa concentração de proteínas no GCF e a necessidade de métodos analíticos sensíveis e reprodutíveis. A validação de biomarcadores identificados requer estudos longitudinais amplos com amostras bem caracterizadas.

A identificação de biomarcadores específicos do GCF pode oferecer benefícios significativos na prática clínica. Esses biomarcadores têm potencial para diagnóstico precoce, prognóstico da progressão da doença periodontal e monitorização da resposta ao tratamento. Além disso, a compreensão mais profunda da composição proteica do GCF pode abrir portas para terapias personalizadas e direcionadas, auxiliando na abordagem mais eficaz das condições periodontais (6).

Embora os estudos tenham avançado na identificação de biomarcadores, desafios persistem, como o estabelecimento de um protocolo de preparação e análise, a validação e replicação dos resultados em diferentes populações, além da compreensão completa do papel de cada biomarcador no contexto da saúde e doença periodontal (5). Recentes avanços tecnológicos na MS e no processamento de dados bioinformáticos têm melhorado significativamente a sensibilidade, especificidade e *throughput* da análise proteômica, permitindo a identificação de biomarcadores previamente inacessíveis. Estudos integrativos que combinam proteômica com outras abordagens ômicas estão começando a desvendar a complexidade da doença periodontal em um nível molecular mais profundo. Por exemplo, a integração de dados proteômicos com dados genéticos e metabólicos tem o potencial de identificar redes de sinalização e vias metabólicas alteradas na doença periodontal, proporcionando novos alvos para intervenções terapêuticas (7).

Biomarcadores específicos podem permitir o diagnóstico precoce da doença periodontal, antes da manifestação clínica de perda de inserção ou destruição óssea, permitindo intervenções mais oportunas e potencialmente menos invasivas. Além disso, biomarcadores podem ser utilizados para monitorizar a resposta do paciente ao tratamento, facilitando a personalização das estratégias terapêuticas (8). A longo prazo, a pesquisa em proteômica do GCF pode conduzir ao desenvolvimento de novas terapias direcionadas, baseadas em mecanismos moleculares específicos identificados através de biomarcadores. Com todos os desafios metodológicos, avanços tecnológicos na análise proteômica e bioinformática são necessários para a evolução dessa área de pesquisa.

2. MATERIAS E MÉTODOS

A pesquisa bibliográfica para a presente monografia de revisão foi concretizada em diferentes bases de dados (Scopus, Pubmed, Web Of Science), sem limite temporal, restrita aos idiomas português e inglês.

Os artigos foram selecionados de acordo com o seu título, depois pela leitura do resumo e, por fim, pela sua leitura integral. Relativamente aos critérios de inclusão, foram incluídos artigos de ensaios clínicos e disponibilidade do texto integral.

Para a seleção de artigos utilizados, primeiramente foram analisados os títulos, depois o resumo e por fim efetuada a leitura na íntegra do artigo. Como critérios de inclusão, incluímos estudos que utilizaram a MS para análise global de todas as proteínas de amostras de GCF, independente da metodologia de coleta e análise das proteínas utilizada e ano de publicação.

Foram excluídos artigos que avaliaram apenas proteínas ou metabólitos ou que não tinham como propósito a identificação de todas as proteínas das amostras. Foram excluídos os artigos sem relação com os objetivos estabelecidos para a realização desta revisão bibliográfica.

Foram utilizadas diferentes palavras-chave: “Gingival fluid AND Proteomics”, “Gingival fluid AND Mass spectrometry”, “Gingival crevicular fluid AND Proteomics”, “Gingival crevicular fluid AND Mass spectrometry”, “Gingival fluid and Peptidomics” e “Gingival crevicular fluid and Peptidomics”.

3. RESULTADOS

A pesquisa inicial resultou num total de 125 artigos potencialmente selecionáveis, dos quais 42 foram selecionados para análise do título e resumo. Para a leitura integral dos artigos, restaram 40 artigos. A análise dos textos completos levou à inclusão de 32 artigos para esta revisão bibliográfica, como representado na figura 1. É apresentado na tabela 1 e 2 uma síntese dos artigos utilizados.

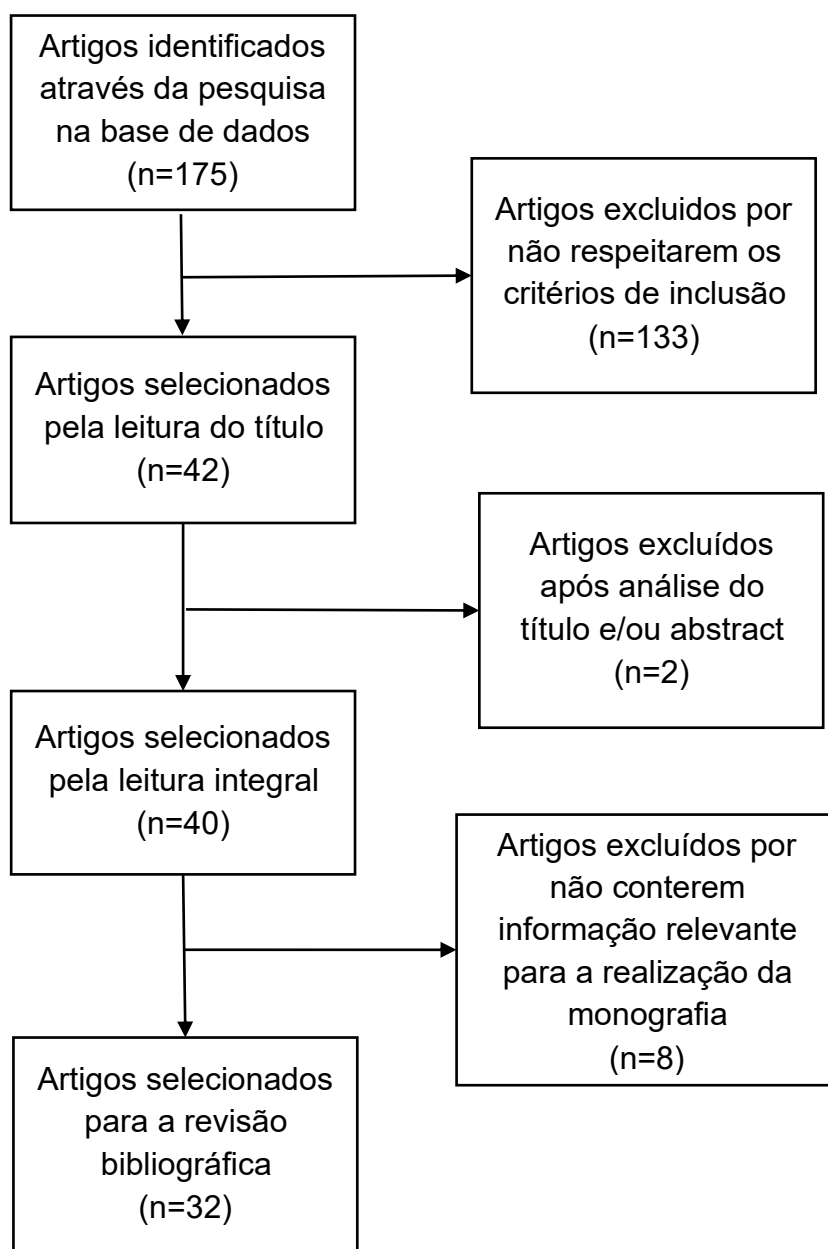


Figura 1. Fluxograma do processo de seleção dos artigos incluídos.

Tabela 1. Síntese das características principais dos estudos em proteômica do GCF.

Autor e Ano	Amostra de indivíduos	Sítios de amostra coletados	Método de coleta	Técnica proteômica	Número de proteínas identificadas
Bostanci et al., 2010 (9)	10 indivíduos, 5 indivíduos saudáveis e 5 com periodontite agressiva generalizada	4 bolsas periodontais mais profundas (um sítio por quadrante) em pacientes com periodontite agressiva. No grupo saudável, as amostras de GCF foram recolhidas de quatro sítios padrão (um primeiro molar e um incisivo central em cada maxilar)	Tiras de Periopaper (ProFlow Inc., Amityville, NY, EUA)	LC/MSE	154 proteínas de origem humana, bacteriana e viral
Grant et al., 2010 (10)	10 indivíduos saudáveis	Sítios controle e com periodontite induzida por modelo spit mouth	Tiras de Periopaper (ProFlow Inc.,	LC-MS/MS usando MS de ressonância ciclôtrica de	186 proteínas humanas e 16 bacterianas

			Amityville, NY, EUA)	íons de transformada de Fourier e etiquetas de massa isobáricas iTRAQ	
Choi et al., 2011 (11)	Indivíduos saudáveis, com gengivite e periodontite crônica (CP), não informa o número	Sítios coletados representativos das condições descritas	Ponta de carregamento de gel estéril (DASLAB, Espanha).	Digestão in-gel seguida por análise LC-ESI-MS/MS	305 proteínas, com 45 mostrando expressão diferencial entre pacientes com periodontite moderada e indivíduos saudáveis
Baliban et al., 2012 (12)	12 indivíduos com CP e 12 saudáveis	Recolhidas de sítios pré-selecionados com profundidade de sondagem >6 mm e <8 mm em pacientes com	Tiras de Periopaper (ProFlow Inc., Amityville, NY, EUA)	Digestão de proteínas com tripsina, HPLC, análise fragmentada com	432 proteínas humanas identificadas (120 novas)

		periodontite e, para saúde periodontal, de sítios mesio-bucais do primeiro molar.		MS em tandem (MS/MS)	
S.Tsuchida et al., 2012 (13)	16 participantes (10 homens, 6 mulheres, idade média 36 anos)	Sítio labial de incisivos maxilares sem coroa ou restauração	Pontas de papel absorvente (ZIPPERER, Munich, Germany)	2DE, SDS-PAGE, análise Western Blot, HPLC com LTQ-XL, HPLC com LTQ-Orbitrap XL, LC-MS/MS	327 proteínas identificadas
Carneiro et al., 2012 (14)	9 indivíduos saudáveis	Segundos e terceiros molares	Tiras de Periopaper (ProFlow Inc., Amityville, NY, EUA)	Técnicas avançadas de cromatografia líquida de nano-fluxo e MS	199 proteínas
Kido et al., 2012 (15)	9 participantes, incluindo 8 com periodontite e 1 indivíduo saudável	Bolsas periodontais < 6 mm de e de sítios saudáveis com 2 mm	Tiras de Periopaper (ProFlow Inc.,	Eletroforese em gel de poliacrilamida e nano LC-MS/MS	168 proteínas em amostras de sítios saudáveis e 167 de sítios com

			Amityville, NY, EUA)			periodontite, com 104 proteínas comuns a ambos.
Baliban et al., 2013 (16)	96 participantes, divididos entre indivíduos saudáveis e com doença periodontal	4 sítios pré-selecionados. Para casos de periodontite, a amostra foi colhida de sítios com PBS >6 mm e 8mm. Para indivíduos saudáveis foi colhida dos sítios mesio vestibulares dos primeiros molares	-		LC-MS/MS	De 42 a 190 para cada amostra diferente
Bostanci et al., 2013 (17)	20 participantes divididos em grupos de indução e resolução de gengivite	Pares de amostras foram obtidos de sítios mesio palatinos e disto palatinos	Tiras de Periopaper (ProFlow Inc., Amityville, NY, EUA)		LC-MS/MS	287 proteínas incluindo humanas, de bactérias, fungos e leveduras

Silva-Boghossian et al., 2013 (18)	10 indivíduos, divididos entre 5 com CP e 5 saudáveis	14 sítios representativos de cada condição	Tiras de Periopaper (ProFlow Inc., Amityville, NY, EUA)	LC-ESI-MS/MS	230 proteínas
Tsuchida et al., 2013 (19)	31 pacientes com CP e 16 controles saudáveis	Sítios vestibulares de incisivos maxilares dos saudáveis e sítios com profundidade à sondagem >6 a <8 mm com doença periodontal	Pontas de papel (Zipperer, Munich, Germany)	TMT sixplex e LC-MS/MS	619 proteínas
Carneiro et al., 2014 (20)	40 participantes saudáveis e 40 com doença periodontal	4 sítios diferentes por participante	Tiras de Periopaper (Oraflow, Plainview, NY, EUA)	Marcadores isotópicos estáveis (ICAT e mTRAQ) e LC-ESI-MS/MS	238 proteínas com 180 quantificadas em ambos grupos
Huynh et al., 2015 (21)	45 homens divididos em 3 grupos, saudáveis, gengivite e periodontite crónica	Foram coletados sítios representativos de cada estado periodontal	Tubos micro capilares de vidro (Drummond Scientific,	One-dimensional Gel Electrophoresis	121 proteínas

			Brookmall, PA, and Nano-LC-EUA)		ESI-MS	
Batschkus et al., 2017 (22)	5 participantes com CP	Até 6 sítios por indivíduo em incisivos e caninos inferiores	Tiras Periopaper (Oraflow Inc., NY, EUA)	de	SDS-PAGE e MS de alta resolução	Na amostra A, 990 proteínas ou clusters puderam ser identificados enquanto 1305 proteínas foram identificadas na amostra B
Guzman et al., 2018 (23)	10 participantes com CP	4 sítios representativos da doença	Tiras Periopaper (Oraflow Inc., NY, EUA)	de	nanoflow LC-MS/MS	Entre 55 e 204 em pacientes diferentes
Marinho et al., 2019 (24)	20 participantes, 5 com diabetes tipo 2 e periodontite, 5 com diabetes e saudáveis, 5 saudáveis com	15 sítios distribuídos aleatoriamente	Tiras Periopaper (Oraflow, Plainview, NY, EUA)	de	i-TRAQ e LC-MS/MS	361 proteínas, sendo 187 com diferenças significativas entre os grupos

	periodontite e 5 totalmente saudáveis				
Kim et al., 2021 (25)	78 participantes, 23 saudáveis e 55 com periodontite	Bolsas periodontais inflamadas	Pontas de papel absorvente (Meta Biomed Co., Ltd.)	LC-MS/MS	1295 proteínas
Xiao et al., 2021 (26)	10 participantes saudáveis	6 sítios por dente em dentes saudáveis	Pontas de papel (Meta Biomed)	2D-LC-MS/MS	3680 proteínas (2540 com pelo menos dois peptídeos únicos)
Yi et al., 2021 (27)	28 pacientes com periodontite e 7 saudáveis	Lesões severas em cada quadrante em pacientes periodontais, e incisivos centrais e primeiros molares para participantes saudáveis	Tubos microcapilares de vidro estéreis (Drummond Scientific, EUA)	MALDI-TOF MS e LC-MS/MS	Não informa
Bellei et al., 2022 (28)	12 participantes, com periodontite severa	Sítios saudáveis e que precisavam de cirurgia devido a periodontite severa	Filtro de papel estéril (Whatman 67 gr/m ² , TISCH Scientific, Cleves, OH, EUA)	SDS-PAGE e LC-ESI-QO-MS/MS	26 proteínas com diferenças significativas, incluindo 14

						aumentadas e 12 diminuídas
Grant et al., 2022 (29)	190 participantes abrangendo doadores saudáveis, com gengivite, periodontite e edêntulos,	Sítios mesio vestibular dos dentes superiores direitos 6, 4, 3 e superiores esquerdos 3, 4, 6	Tiras de Periopaper (Oraflow Inc., NY, EUA)	Marcadores iTRAQ 8-plex analisadas usando um Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido),		95 proteínas
Zhang et al., 2022 (30)	40 adultos saudáveis	Coletadas de locais menos e mais suscetíveis à doença periodontal	Tiras de papel (não identificadas)	iTRAQ 2D LC-MS/MS		2018, 1825, 1219 e 1213 proteínas nos grupos de homens jovens, mulheres jovens, homens idosos e mulheres idosas, respectivamente

Lee et al., 2023 (31)	215 participantes, sendo 85 saudáveis e 130 com periodontite	Sítios mesio vestibular e disto vestibular dos primeiros e segundos pré-molares superiores	Pontas de papel (Meta Biomed)	LC-MS/MS	1422 proteínas identificadas
Torres et al., 2023 (32)	5 pacientes masculinos saudáveis	10 sítios candidatos por paciente. 5 sítios sem progressão e 5 sítios com progressão	Tiras de Periopaper (Oraflow Inc., Plainview, NY, EUA)	HPLC-MS/MS	1500 proteínas identificadas no grupo que progrediu a periodontite e 1504 no grupo que não progrediu a periodontite
Xiao et al., 2023 (33)	16 participantes no total. 8 pacientes com periodontite e 8 pacientes com saúde periodontal	6 dentes por participante, incluindo molares e incisivos	Pontas de papel absorvente	LC-MS/MS	570 proteínas humanas e 51 microbianas

Tabela 2. Síntese das características principais e resultados relevantes dos estudos em peptidômica do GCF.

Autor e Ano	Amostra de indivíduos	Sítios de amostra coletados	Método de coleta	Técnica proteômica	Número de proteínas identificadas
Ngo et al., 2010 (34)	12 pacientes com periodontite	Até 5 sítios por indivíduo, excluindo molars (exceto sua superfície mesial)	Tubos microcapilares de vidro estéreis de 2 µL (Drummond Scientific, Brookmall, PA)	MALDI-TOF/TOF MS e nanoLC-ESI-MS/MS	33 peptídeos e 66 proteínas
Ngo et al., 2013 (35)	41 pacientes em manutenção periodontal	5 sítios mais profundos e molares, excluindo sítios mesiais	Tubos microcapilares de vidro (Drummed Scientific, Brookmall, PA, EUA)	MALDI-TOF MS	-

Preiano et al., 2014 (36)	4 participantes saudáveis	Sítios disto vestibulares de 4 incisivos maxilares	Pontas de papel e tiras de papel	MALDI-TOF MS	-
Preiano et al., 2016 (37)	4 participantes	Sítios disto vestibulares de 4 incisivos maxilares	Tiras de papel para cromatografia 1MM (Whatman Lab Sales Ltd. Maidstone, Kent U.K.)	MALDI-TOF MS	-
Preiano et al., 2018 (38)	20 participantes, divididos igualmente entre aqueles com gengivite e controles saudáveis.	Nos saudáveis de sítios bucais de incisivos e nos com gengivite de sítios representativos da doença	Tiras de papel para cromatografia (Whatman 1 MM)	MALDI-TOF MS	-
Antezack et al., 2020 (39)	141 participantes, 67 com periodontite e 74 saudáveis	4 sítios no total por paciente. Sítios saudáveis em pacientes	Pontas de papel absorventes (N°20, VDW-Zipperer)	MALDI-TOF MS	-

		saudáveis, e sítios doentes em paciente com periodontite				
Yuan et al., 2021 (40)	17 participantes antes e depois de tratamento periodontal	6 dentes de amostra (11, 31, 16, 26, 36, e 46)	Tiras de papel (Whatman Sales Ltd.)	Lab	MALDI-TOF MS e nano-LC/ESI-MS/MS	-

4. DESENVOLVIMENTO

4.1 Desafios analíticos e pré-analíticos

A análise proteômica de fluidos corporais humanos é desafiadora devido ao grande número de proteínas que estão presentes. No GCF a estimativa é de mais de 20.000, excluindo-se as possíveis isoformas (41). Quando comparamos as identificações nos estudos com GCF, percebemos que há um número crescente de proteínas identificadas com a evolução das técnicas eluição, identificação e busca bioinformática.

Até ao momento, não se explorou amplamente o impacto de diferentes protocolos de amostragem nem a influência das condições pré-analíticas e analíticas. As limitações inerentes do GCF devido à sua pequena quantidade em gengivas saudáveis e à sua heterogeneidade nas doenças periodontais levantam várias questões, especialmente em estudos comparativos que exigem protocolos rigorosos para a recuperação de proteínas e a normalização dos dados de MS. Problemas relacionados com desnaturação devido às condições de armazenamento também são preocupantes.

Adicionalmente, as investigações são condicionadas pela variabilidade interindividual das amostras de GCF e grande parte das investigações são realizadas em grupos de tamanho reduzido, não garantindo uma análise estatística suficientemente robusta. A variação individual na expressão de proteínas pelos indivíduos pode ser minimizada com o aumento do número de amostras, entretanto a variedade advém de outros fatores interferentes como as diferentes técnicas de coleta, preparação de amostras e manejo, pré-fracionamento das proteínas, depleção por afinidade de proteínas mais abundantes, separação por cromatografia multidimensional, quantificação de proteínas, análise de dados e critérios de busca em bancos de dados (42).

A presença de proteínas mais abundantes no GCF como a albumina, pode interferir na detecção de proteínas menos abundantes. Para avaliar essa influência um estudo propôs uma nova estratégia de remoção de albumina com precipitação ácida com ácido tricloroacético/acetona. O procedimento foi aplicado a amostras de GCF

coletadas de cinco pacientes adultos com CP e foram submetidas a dois métodos distintos. Nas amostras A foram identificadas 990 proteínas ou *cluster* de proteínas, enquanto na amostra B foram identificadas 1305 proteínas. 988 proteínas foram identificadas nos dois métodos, sendo apenas 2 identificadas no método sem fracionamento. A nova estratégia de depleção de albumina foi capaz de identificar 317 proteínas a mais que o método A. A análise demonstrou que a precipitação com ácido tricloroacético/acetona reduziu eficientemente o conteúdo de albumina sérica e aumentou a identificação subsequente de proteínas em 32% (22).

Visando identificar os fatores influenciadores dos indivíduos, incluindo localização dentária, sexo e idade, em indivíduos saudáveis, outro estudo dividiu quarenta adultos saudáveis em grupos de treinamento e teste. Os resultados revelaram diferenças proteômicas médias entre locais dentários suscetíveis e menos suscetíveis à periodontite, com 85 proteínas diferencialmente expressas identificadas entre sexos no grupo jovem e apenas 7 no grupo mais velho, demonstrando que o sexo tem um efeito significativo nas proteínas do GCF em adultos jovens, mas seu impacto diminui em adultos mais velhos. Além disso, foram encontradas 203 proteínas associadas à idade no grupo masculino e 235 no grupo feminino, destacando a idade como um fator de impacto importante. A anotação funcional dessas proteínas diferencialmente expressas indicou que as proteínas relacionadas ao sexo estavam principalmente associadas à função imunológica e ao metabolismo, enquanto as proteínas relacionadas à idade estavam primariamente associadas à inflamação, ao metabolismo lipídico e à função imunológica (30).

Por fim, a comparação dos resultados obtidos entre vários grupos de pesquisa não é direta e a estratégia adotada (*bottom-up* ou *top-down*) deve também ser considerada. Para a definição de biomarcadores que possam servir de diagnóstico ou preditivos da perda de inserção, é preciso que haja a definição do baseline de saúde periodontal e devido a essa grande variação de resultados dos estudos é de difícil definição.

4.2 Preparação de amostras para espectrometria de massas (MS)

As abordagens proteômicas e peptidômicas têm como objetivo analisar o perfil completo de proteínas e peptídeos tanto em estados de saúde quanto em doenças

periodontais. Para tal, utilizam-se duas estratégias metodológicas: a abordagem *bottom-up*, que digere as proteínas em peptídeos, e a *top-down*, que analisa as proteínas intactas. A abordagem *bottom-up*, é a mais amplamente utilizada sendo a *top-down* com menor número de reportes. Ambos os métodos iniciam com a coleta e processamento de amostras. A coleta do GCF pode ser realizada com tiras de papel, tubos microcapilares de vidro ou fios gengivais, sendo a coleta com tiras de papel a mais utilizada.

A eluição das amostras é realizada através de métodos diversos em meios aquosos ou orgânicos. Na proteômica *bottom-up*, as amostras sofrem um processo de digestão proteica, que cliva as proteínas transformando-as em moléculas menores de peptídeos e mais “abertas” para serem detetadas mais facilmente pela MS. Os peptídeos são fracionados usando técnicas de resolução multidimensional antes da análise por MS, para diminuir a complexidade da mistura. Podem ser usados métodos baseados em gel, 1DE ou 2 DE, ou gel-free, como a cromatografia. Na peptidômica *top-down* podem ser usadas técnicas de separação como a eletroforese e/ou cromatografia. Em ambas as técnicas, uma vez que as amostras estão preparadas, são ionizadas para serem analisadas através da sua relação massa/carga pelo MS, como os quadrupolos, *time-of-flight* ou frequência de ressonância massa/carga (*ion trap, orbitrap and ion cyclotron resonance*). Finalmente após a análise, as proteínas detetadas são identificadas utilizando algoritmos como SEQUEST ou MASCOT.

4.3 Proteômica / abordagem *bottom-up*

Na última década, o impacto da proteômica para a compreensão da composição do GCF humano tem aumentado progressivamente, destacando o potencial papel diagnóstico desse fluido como uma fonte inestimável de marcadores específicos para doenças periodontais. Nessa seção serão discutidos os estudos que utilizaram a abordagem *bottom-up*.

Desses estudos, alguns focaram em analisar o perfil proteico de pacientes saudáveis. Um estudo pioneiro em 2012 resultou na identificação de 199 proteínas. Uma análise cruzada permitiu discernir que delas, 105 (57%) também estão presentes no plasma, enquanto 94 (43%) parecem ser únicas ao microambiente do GCF. Esta diferenciação destaca não apenas a contribuição sistêmica através do soro, mas

também enfatiza a existência de proteínas específicas ao microambiente gengival (11). Logo após este, outro estudo em pacientes saudáveis com um protocolo que combinou tampão de ureia com ultrafiltração permitiu identificar 327 proteínas, incluindo superóxido dismutase 1, uma proteína chave no metabolismo lipídico, apolipoproteína A-I, uma enzima crucial na defesa antioxidante contra espécies reativas de oxigênio e dermcidina, um peptídeo antimicrobiano previamente não associado ao GCF (15).

Em 2021, um estudo apresentou uma análise mais abrangente do proteoma e metaproteoma de indivíduos saudáveis, identificando um total de 3680 proteínas humanas, das quais 2540 foram identificadas com pelo menos dois peptídeos únicos, sendo estas principalmente associadas a funções imunes e inflamatórias. A análise comparativa do proteoma do GCF com o do plasma e da saliva indicou que o GCF compartilha a maioria das proteínas altamente abundantes com esses fluidos, mas com um perfil único que reflete sua função especial no microambiente oral (26).

Dois estudos avaliaram a gengivite na sua fase de indução e resolução, empregando um modelo de gengivite experimental de 21 dias em voluntários saudáveis. No primeiro foram identificadas 16 proteínas bacterianas e 186 proteínas humanas. Entre as proteínas humanas identificadas, houve uma vasta gama de funções, incluindo proteínas séricas, proteínas com propriedades antibacterianas, e proteínas associadas à transcrição celular, ligação ao DNA, citoesqueleto, adesão celular e cílios. Através de análises estatísticas e de agrupamento (*clustering*), os pesquisadores observaram padrões específicos de expressão proteica que se correlacionavam com as fases de indução e resolução da gengivite. Certas proteínas mostraram aumentos ou diminuições em pontos específicos do estudo, sugerindo papéis potenciais na modulação da resposta inflamatória gengival ou na manutenção da saúde periodontal. Por exemplo, a apolipoproteína B-100, associada a lipoproteínas de baixa densidade, mostrou um pico de expressão que coincide com o aumento da inflamação gengival, sugerindo sua possível utilização como marcador de microulcerações do epitélio sulcular (10). O segundo estudo foi capaz de identificar um total de 287 proteínas, incluindo proteínas humanas, bacterianas, fúngicas e de leveduras. A análise ontológica revelou funções primariamente envolvidas em rearranjos do citoesqueleto, resposta imune, função antimicrobiana, degradação de proteínas e ligação ao DNA (17).

Outros estudos avaliaram a diferença qualitativa e quantitativa do proteoma do GCF em pacientes com doença periodontal e saudáveis na busca por um biomarcador preditivo de atividade de doença. O estudo realizado por Bostanci e colaboradores em 2010, comparou indivíduos saudáveis e pacientes com periodontite agressiva generalizada. Foram identificadas 154 proteínas de origem humana, bacteriana e viral em 40 amostras, destacando uma maior proporção de proteínas bacterianas, virais e de leveduras em pacientes com doença comparados aos saudáveis. Este estudo também confirmou a presença de proteínas relacionadas à defesa do hospedeiro, como Cystatin-B e defensinas, exclusivamente em indivíduos saudáveis, sugerindo que estas proteínas têm um papel protetor. Além disso, o estudo introduziu proteínas previamente não identificadas no GCF, como L-plastin, somente detetada em casos de doença, e Annexin-1, encontrada em níveis significativamente mais altos em indivíduos saudáveis (9).

Choi e colaboradores focaram na identificação de biomarcadores proteicos para periodontite e identificaram 305 proteínas no GCF, das quais aproximadamente 45 mostraram expressão diferencial entre indivíduos saudáveis e pacientes com periodontite moderada. Dentre as proteínas identificadas, a azurocidina foi destacada por sua expressão aumentada em pacientes com periodontite, sendo detetada exclusivamente no GCF e não na saliva. A azurocidina, que não havia sido previamente associada ao GCF, é conhecida por suas propriedades antimicrobianas e capacidade de inibir a diferenciação de macrófagos em osteoclastos, sugerindo um papel protetor potencial contra a perda óssea alveolar durante as fases iniciais da periodontite. Os resultados foram validados através de ensaio de ELISA, confirmando os resultados (11).

Para investigar a alteração de biomarcadores após o tratamento periodontal, Guzman e colaboradores coletaram amostras de GCF aplicando métodos de filtragem matemática aos dados proteômicos. Foi identificado um pequeno subconjunto de proteínas, incluindo azurocidina, lisozima C e miosina-9 como biomarcadores candidatos proeminentes na linha de base, e a actina alfa-lisa muscular como marcante 13 semanas após o tratamento (23).

Kim e colaboradores identificaram um total de 1295 proteínas e entre elas, a galectina-10 (Gal-10) se destacou como significativamente mais abundante no GCF de pacientes com periodontite. A pesquisa explorou o papel da Gal-10 na inflamação

oral, descobrindo que seu aumento está associado à indução de prostaglandina E2 em queratinócitos orais e fibroblastos gengivais, além de elevar os níveis de interleucina-8, MMP-9, proteína C-reativa no meio condicionado de fibroblastos gengivais tratados com Gal-10 recombinante. O estudo observou que o meio condicionado dos fibroblastos tratados induziu a diferenciação de osteoclastos, sugerindo um papel direto da Gal-10 na osteoclastogênese associada à periodontite. Esses resultados enfatizam a Gal-10 como um biomarcador potencial para o diagnóstico de periodontite, destacando sua contribuição para processos inflamatórios e de destruição tecidual associados à doença (25). Esse achado foi corroborado por outro autor que também encontrou a Gal-10 elevada em pacientes com a periodontite (31).

Com foco na proteína Alfa-Defensina 1 (DEFA-1), Lee e colaboradores demonstraram que DEFA-1 está significativamente elevada no GCF de pacientes com periodontite, sugerindo sua relevância tanto no processo da doença quanto como um biomarcador diagnóstico potencial para periodontite. O estudo demonstrou também que DEFA-1 possui um efeito inibitório significativo na formação de osteoclastos em ensaios com macrófagos derivados de medula óssea, sugerindo um papel regulador no processo da periodontite. A comparação de DEFA-1 com outros biomarcadores propostos para periodontite, como gal-10, ODAM e azurocidina, revelou que DEFA-1 proporciona uma distinção mais eficaz entre GCF saudável e doente (29).

A azurocidina foi destacada por dois autores como um forte candidato a biomarcador para a periodontite (11, 23). Entretanto outro autor encontrou resultados conflitantes, estando a azurocidina aumentada nos pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) e CP, porém não houve diferença significativa entre o grupo com CP e os saudáveis (24). Outro autor destaca que a DEFA-1 é um biomarcador mais confiável que a azurocidina e Gal-10 (31). Porém ainda não há consenso na definição de um biomarcador ideal.

O estudo de Baliban e colaboradores identificou entre as proteínas humanas, angiotensinogênio, clusterina e timidina fosforilase, que foram identificados como candidatos a biomarcadores baseados em sua alta pontuação apenas em amostras de saúde periodontal. Da mesma forma, defensina-1 de neutrófilos, anidrase carbônica-1 e fator de alongação-1 gama foram associados com a periodontite. Biomarcadores bacterianos candidatos incluem 33 kDa chaperonina, proteína de

captação de ferro A2 e fosfoenolpiruvato carboxilase, associados à saúde, e ribulose bifosfato carboxilase, uma provável succinil-CoA:3-cetoácido-coenzima A transferase ou DNA-direcionada RNA polimerase subunidade beta, associados a CP (12).

Kido e colaboradores exploraram a composição proteica do GCF em indivíduos com saúde periodontal e com periodontite identificando 104 proteínas. Curiosamente, 64 proteínas foram exclusivas das amostras de sítios saudáveis, enquanto 63 foram identificadas somente nas amostras de sítios com periodontite. Estas proteínas abrangiam uma variedade de funções, incluindo relações com sangue, citoesqueleto, imunidade, inflamação, lipídeos e enzimas. Várias proteínas foram identificadas pela primeira vez no GCF, como a ceruloplasmina, glicogênio fosforilase, glutathione S-transferase, fosfoglicerato mutase, psoriasina e resistina. A análise revelou a presença de peptídeos antimicrobianos, como lactoferrina, α 1-antitripsina, lipocalina, S100A7, S100A8, S100A9 e catelicidina, tanto por MS quanto por western blotting (14).

Baliban e colaboradores utilizaram uma combinação de análise proteômica de alto rendimento e modelagem de otimização linear mista inteira (MILP) que foi capaz de identificar uma combinação de biomarcadores que distinguem claramente uma amostra como saudável ou doente. Esta metodologia permitiu uma precisão de diagnóstico superior a 99% em um conjunto de testes. A análise revelou que uma combinação de 7 proteínas humanas e 3 proteínas bacterianas era capaz de prever corretamente o estado de saúde periodontal em 40 de 41 amostras em dois conjuntos de testes cegos. Alguns dos biomarcadores humanos incluídos na combinação foram a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e a lisozima C, junto com outros biomarcadores bacteriano (16).

Silva-Boghossian e colaboradores quantificaram a composição proteômica do GCF em diferentes condições periodontais. Foram identificadas 230 proteínas distintas no GCF, revelando diferenças significativas na composição proteômica entre os sítios saudáveis e aqueles afetados pela CP. Os resultados mostraram que 145 proteínas estavam presentes em indivíduos com saúde periodontal, enquanto 214 proteínas foram detetadas em sítios com periodontite, 154 em sítios com gengivite e 133 em sítios saudáveis. O estudo também destacou a existência de proteínas exclusivas ou diferencialmente abundantes em diferentes condições periodontais. Por exemplo, quatro proteínas foram identificadas exclusivamente em indivíduos saudáveis, enquanto 43 proteínas foram exclusivas de sítios com periodontite. A

análise quantitativa das proteínas revelou que 35 proteínas estavam significativamente mais abundantes em sítios com periodontite em comparação com sítios saudáveis. Os níveis de lisozima foram validados através de ensaios de ELISA, uma proteína bem caracterizada no ambiente oral, corroborando os resultados obtidos pela análise proteômica e destacando a confiabilidade das técnicas de MS na detecção de biomarcadores periodontais (18).

O estudo de Tsuchida e colaboradores avaliaram indivíduos saudáveis e pacientes com doença periodontal, identificando um total de 619 proteínas. Entre essas proteínas, a metaloproteinase de matriz (MMP)-9 e a lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (LCN2), foram destacadas por estarem envolvidas na progressão da doença periodontal. Análises adicionais por Western blot revelaram que os níveis de MMP-9 e LCN2 estavam significativamente mais altos em pacientes com doença periodontal em comparação com indivíduos saudáveis. A confirmação por ELISA também detetou níveis significativamente mais elevados de LCN2 em pacientes com doença periodontal, sugerindo que a LCN2 pode ser um biomarcador promissor (19).

Carneiro, Nouh e Salih analisaram amostras de GCF de 40 indivíduos saudáveis e 40 pacientes com doença periodontal, identificando um total de 238 proteínas distintas, das quais 180 foram quantificadas tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes periodontais, com 26 e 32 proteínas identificadas exclusivamente em cada grupo, respectivamente. Entre as proteínas identificadas, várias não haviam sido quantificadas anteriormente por meio de abordagens proteômicas em grande escala no GCF, ressaltando a relevância de proteínas como a cadeia C da Ig alfa-2, Kallikrein-4, S100-A9, e várias formas de colágeno, bem como proteínas bacterianas patogênicas, destacando-se como potenciais biomarcadores para a doença periodontal. O estudo definiu 50 proteínas do hospedeiro e 16 proteínas bacterianas patogênicas significativamente elevadas na doença periodontal (20).

O estudo conduzido por Huynh e colaboradores avaliou indivíduos com periodonto saudável, gengivite e CP identificando 121 proteínas no GCF, com 42 consideradas significativamente alteradas em abundância entre as condições analisadas. Dentre as descobertas, proteínas como cistatina B e cistatina S apresentaram uma redução na abundância da saúde para a gengivite e ainda mais na CP, sugerindo uma possível degradação proteolítica ou consumo dessas proteínas

em estados de doença, no entanto tais achados não foram confirmados por outros autores. Em contrapartida, proteínas do complemento mostraram um aumento da saúde para a gengivite, seguido por uma diminuição na CP. A análise também revelou a presença de proteínas como fibronectina, precursora da lactotransferrina, proteína 14-3-3 zeta/delta, neutrofilina defensina 3 e alfa-actinina, que exibiram flutuações nos níveis entre as condições de saúde e doença (21).

A publicação de Marinho e colaboradores destaca uma investigação proteômica do GCF em indivíduos com *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), CP, aqueles afetados por ambas as condições e indivíduos saudáveis. O estudo conseguiu quantificar a abundância relativa de proteínas nas várias condições estudadas, identificando um total de 104 proteínas com diferenças significativas na abundância entre os grupos. Proteínas com níveis alterados em todos os grupos doentes comparados ao controle saudável incluem o fator de troca de nucleotídeo de guanina Rap, S100A8, S100A9 e imunoglobulinas, sugerindo um papel crucial na patogênese da periodontite e potencialmente na interação entre periodontite e diabetes (24). Os achados destacam a complexidade da resposta do hospedeiro à periodontite e ao 2DM, com alterações significativas na composição proteica do GCF que refletem o estado inflamatório e metabólico do indivíduo. Proteínas como a titina, elastase de neutrófilos e mieloperoxidase apresentaram níveis elevados especificamente no grupo com diabetes e periodontite, sugerindo uma resposta inflamatória exacerbada em pacientes com ambas as condições

A presença de proteínas circulantes da família S100 tem sido associada com condições inflamatórias como obesidade, artrite reumatoide e doenças cardiovasculares (43). No DM2, seu efeito na sensibilidade à insulina em humanos ainda precisa ser investigado, mas em modelos animais já foram demonstradas algumas relações (44). No GCF elas estão associadas com a inflamação gengival, fazendo parte da resposta imune inata. As proteínas S100-A8 e S100-A9 são ligantes de íons metálicos, como cálcio e zinco, e já foram relatadas como aumentadas no FCG de indivíduos com periodontite (17, 20). Elas são capazes de se associar formando um complexo chamado Calprotectina que é encontrado em grande quantidade no citoplasma de neutrófilos, as primeiras células na linha de defesa nos tecidos periodontais. Quando ligada ao cálcio, possui a capacidade de sequestrar os íons essenciais zinco e manganês de bactérias e fungos, que o confere sua

capacidade antimicrobiana. A calprotectina já foi relatada no soro/plasma (45) e em outros fluidos corporais, como no fluido cerebrospinal, fluido sinovial, urina, fezes e saliva (46). No GCF esse complexo foi relatado como aumentado em alguns indivíduos na fase inicial de inflamação gengival em gengivite experimental (47).

Uma tendência crescente observada nos artigos mais recentes é a busca por um grupo de biomarcadores, tanto aumentados quanto diminuídos, ao invés da busca de apenas um biomarcador que predisponha a periodontite. Nessa direção, Yi e colaboradores ofereceram uma abordagem inovadora abordando os sedimentos do GCF de pacientes com periodontite e voluntários saudáveis. O estudo demonstrou a aplicabilidade do MALDI-TOF MS na distinção entre perfis moleculares de pacientes com diferentes severidades de periodontite e voluntários saudáveis, através da análise de componentes principais e agrupamento hierárquico. Doze biomarcadores proteicos mais distintivos foram selecionados pela análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) dos espectros de massa MALDI-TOF e identificados por análise proteômica baseada em LC/MS/MS, incluindo 5 proteínas microbianas e 7 proteínas humanas, e depois verificados com amostras de GCF de outros 11 pacientes. Foi destacado pelos autores que essa abordagem não invasiva e de alta eficiência oferece uma nova via para a triagem da periodontite entre a população, potencialmente acessível a profissionais de saúde não especializados em periodontologia, como médicos de família (27).

O estudo de Bellei e colaboradores identificaram 26 proteínas significativamente diferentes, das quais 14 foram reguladas positivamente e 12 negativamente no GCF de sítios com doença em comparação com sítios saudáveis. As proteínas identificadas incluíam moléculas inflamatórias, respondentes imunes e enzimas do hospedeiro, sugerindo uma rede funcional complexa entre essas proteínas. A análise funcional revelou que a maioria das proteínas aumentadas no GCF estava relacionada a processos inflamatórios e respostas imunes, sublinhando o papel significativo da inflamação e da resposta do hospedeiro na patogênese da periodontite. As proteínas diminuídas incluíam diversas formas de queratinas, refletindo a alteração no *turnover* do epitélio sulcular em resposta à doença periodontal (28).

Grant e colaboradores investigaram a eficácia de biomarcadores proteicos na saliva e no GCF para distinguir entre saúde periodontal e doenças periodontais,

incluindo gengivite e periodontite de diferentes severidades abrangendo um total de 190 participantes. Na fase de descoberta proteômica, foram identificadas 95 proteínas tanto na saliva quanto no GCF, destacando a presença de biomarcadores potenciais associados à inflamação, resposta imune e metabolismo do tecido. Quinze proteínas candidatas foram selecionadas com base nas diferenças observadas entre os grupos de doadores, incluindo MMP9, S100A8, glicoproteína alfa-1-ácida (A1AGP) e piruvato quinase, para posterior validação. A validação dos biomarcadores selecionados por ELISA demonstrou que combinações de três a quatro biomarcadores, incluindo MMP-9, S100A8, A1AGP e piruvato quinase, poderiam distinguir eficazmente entre saúde ou gengivite e periodontite, saúde e gengivite, e periodontite leve a moderada versus avançada. Os painéis de biomarcadores apresentaram alta sensibilidade e especificidade, com a área sob a curva variando de 0,764 a 0,960 para as diferentes distinções de estado periodontal.

Torres e colaboradores investigaram as diferenças qualitativas e quantitativas no perfil proteômico do GCF entre sítios periodontais progressivos e não progressivos. O estudo identificou 1504 e 1500 proteínas nos grupos de não progressão (NP) e progressão (PG), respectivamente, com 48 proteínas exclusivas ao PG e 52 ao NP. Além disso, 35 proteínas foram mais abundantes no PG, enquanto 29 foram mais abundantes no NP, indicando diferenças significativas no proteoma do GCF conforme o estado de progressão clínica da periodontite. A análise bioinformática revelou que o grupo NP era predominantemente representado por proteínas associadas a "resposta a estímulos bióticos e outros organismos", "regulação de processos de morte celular", "regulação de peptidases", "ubiquitinação de proteínas" e "atividade ribossomal". Por outro lado, as categorias de Ontologia Genética mais representadas no grupo PG estavam relacionadas à "montagem de complexos multiproteicos", "processos catabólicos", "metabolismo de lipídios" e "ligação à hemoglobina e haptoglobina", indicando um perfil proteico associado a processos catabólicos, resposta imune e resposta ao estresse celular nos sítios de periodontite progressiva. Análises de interação proteína-proteína destacaram proteínas centrais relacionadas a processos de "acetilação", "resposta ao estresse" e "resposta a infecções" no grupo PG, enquanto no grupo NP, as interações proteicas estavam relacionadas a "reparo de feridas", "processos de cura", "regulação da morte celular" e "autofagia mediada por chaperonas". Confirmado por análises de Western Blot, os níveis de IL-6 e MMP-8,

conhecidos por sua relevância na degradação do colágeno e na resposta inflamatória, estavam significativamente elevados no grupo PG em comparação com o NP (32).

O estudo conduzido por Xiao e colaboradores analisou amostras de GCF de oito pacientes com periodontite e oito indivíduos saudáveis, visando caracterizar os perfis proteômicos humano e microbiano. Foram identificadas 570 proteínas humanas diferencialmente expressas, predominantemente associadas a processos como resposta inflamatória, morte celular, junções celulares e metabolismo de ácidos graxos (33).

4.4 Peptidômica / abordagem *top-down*

Nessa seção serão discutidos os estudos que utilizaram a abordagem *top-down*. Quanto à estratégia metodológica, os estudos em peptidômica se baseiam na investigação do perfil proteico do GCF nas quais as amostras não passaram pela etapa de digestão das proteínas antes de serem analisados pela MS. A ausência de uma etapa de digestão antes da análise por MS supera a limitação intrínseca de não distinguir entre os peptídeos naturalmente encontrados no GCF e aqueles gerados artificialmente por proteólise na etapa anterior, necessária para um protocolo *bottom-up*. Portanto, a relevância das abordagens do perfil proteico *top-down* reside no fato de que tais investigações podem revelar de maneira mais direta e clara as funções específicas de proteínas/peptídeos e mecanismos de ação, uma vez que as abordagens *top-down* preservam informações valiosas sobre todas as proteoformas, incluindo a clivagem proteolítica de proteínas maiores pela ação de proteases de origem humana ou bacteriana.

Ngo e colaboradores investigaram de forma pioneira a composição peptidômica do GCF em sítios periodontais inflamados. A pesquisa identificou 33 peptídeos e 66 proteínas no GCF, marcando a primeira vez que muitas dessas moléculas são relatadas nesse contexto. Entre as proteínas identificadas, várias estão diretamente associadas à resposta inflamatória e à defesa do hospedeiro. O estudo também destaca a identificação de peptídeos derivados do catabolismo de proteínas, os quais são relatados pela primeira vez no GCF. A presença de peptídeos derivados de proteínas como a hemoglobina aponta para a potencial atividade antimicrobiana

dessas moléculas no sulco gengival, contribuindo para a complexa rede de defesa do hospedeiro contra patógenos periodontais. Para a época, a técnica aplicada nesse estudo permitiu não apenas a identificação de uma grande variedade de peptídeos e proteínas, mas também proporcionou uma análise detalhada das modificações pós-traducionais (PTMs) e da complexidade molecular do GCF (34).

Em pacientes em manutenção periodontal, os mesmos autores exploraram a relação entre a quantidade relativa de proteínas e peptídeos presentes no GCF na progressão da doença periodontal, medidos por perda de inserção periodontal ao longo de 12 meses. A pesquisa acompanhou 41 indivíduos, coletando GCF em cada visita. Foi observada perda de inserção de mais de 2 mm em 25 sítios em 14 pacientes durante o período de estudo. Os modelos gerados a partir dos espectros de massa do GCF foram capazes de prever a perda de inserção em um sítio com alta especificidade (97% de capacidade de reconhecimento e 67% de validação cruzada). A análise revelou que os índices clínicos convencionais, como profundidade de bolsa, índice de placa modificado, níveis de placa e sangramento à sondagem, serviram como discriminadores pobres dos espectros de massa do GCF. Este achado sugere que os perfis proteômicos do GCF oferecem informações mais detalhadas sobre a condição periodontal que não são capturadas por medidas clínicas padrão (35).

Preianò e colaboradores avaliaram como diferentes métodos de coleta e processamento de GCF afetam a qualidade e a reprodutibilidade dos perfis proteômicos obtidos. A investigação comparou o uso de tiras de papel versus pontas de papel na coleta de GCF, seguido da extração de peptídeos e proteínas por eluição centrífuga em diferentes soluções e velocidades, com e sem a adição de um coquetel inibidor de proteases. O estudo demonstrou que a eluição com ácido trifluoroacético gerou perfis mais ricos em comparação com a eluição com ácido acético, independentemente do dispositivo de coleta utilizado. Além disso, a velocidade de centrifugação e a suplementação com coquetel inibidor de proteases não alteraram significativamente os perfis de GCF. Foi constatada uma modulação eficaz da composição da matriz e da proporção matriz/amostra, resultando em reprodutibilidade satisfatória (CV menor que 10% para área de pico e relação sinal-ruído) (36).

Em 2016, os mesmos autores abordaram a questão crítica de como as condições de armazenamento influenciam o perfil peptídico do GCF. A estabilidade

dos perfis peptídicos é fundamental para a descoberta de biomarcadores confiáveis. Este estudo revela que o armazenamento do GCF imediatamente extraído das tiras de papel, gera menos variações nos perfis moleculares comparados à extração realizada após o armazenamento. Mudanças significativas nos perfis espectrais foram detetadas para amostras de GCF armazenadas a -20°C diretamente nas tiras de papel e extraídas após três meses, em comparação com o controle extraído precocemente. Notavelmente, houve uma diminuição significativa na área de pico de peptídeos importantes, como HNP-3, S100A8 e S100A9 após três meses a -80°C , evidenciando que as alterações no perfil do GCF armazenado podem não apenas afetar a descoberta de biomarcadores baseada em padrões, mas também comprometer sua adequação para testes diagnósticos *in vitro*, especialmente no caso dos biomarcadores propostos S100A8 e S100A9 (37).

Em 2018, Preianò e colaboradores implementaram uma metodologia padronizada com o objetivo de identificar uma assinatura peptídica característica da gengivite. Este estudo revelou um padrão de cinco peptídeos diferencialmente expressos entre grupos de indivíduos saudáveis e aqueles com gengivite. Dentre os biomarcadores identificados, destaca-se o fragmento C-terminal da alfa-1-antitripsina, conhecido como peptídeo C-36, e duas diferentes PTMs da proteína S100A9 de comprimento total. A metodologia descrita permite uma análise comparativa rápida das assinaturas de GCF entre indivíduos saudáveis e aqueles com gengivite, fornecendo um padrão baseado na expressão de peptídeos endógenos e suas PTMs como biomarcadores putativos da gengivite (38).

Antezack e colaboradores apresentaram uma abordagem inovadora no diagnóstico da periodontite. O principal objetivo foi de avaliar se a análise MALDI-TOF poderia classificar com precisão esses tipos de amostras de acordo com o estado periodontal, propondo uma metodologia rápida, rotineira e cega para a classificação das amostras. Foram coletadas amostras de 141 pacientes, sendo 67 com periodontite e 74 saudáveis. A análise diferencial dos picos entre os grupos levou à construção de mapas de decisão diagnóstica para cada tipo de amostra. Para saliva, GCF e placa dental, os mapas de decisão diagnosticaram periodontite com sensibilidade e especificidade variando entre os tipos de amostra, melhorando significativamente para 100% quando pelo menos dois tipos de amostras foram

testados em conjunto. Este estudo desenvolveu, pela primeira vez, testes diagnósticos baseados em perfis proteicos de saliva, GCF e placa dental entre pacientes com periodontite e indivíduos saudáveis, demonstrando que a combinação de análises de ao menos dois tipos de amostras proporcionou os melhores resultados. O uso de MALDI-TOF MS para análise direta das amostras, combinado ao uso de um algoritmo para classificação das amostras, resultou em um desempenho aceitável para classificar corretamente os indivíduos com periodontite e saudáveis (39).

Para avaliar os efeitos do tratamento periodontal no microambiente sulcular, Yuan e colaboradores analisou as mudanças peptidômicas do GCF antes e após o tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes com periodontite generalizada (estágio I/II). O estudo identificou mudanças significativas nos perfis peptidômicos que refletem a eficácia do tratamento periodontal. Um total de 17 pacientes foram incluídos no estudo e as amostras de GCF foram coletadas em três momentos: no início do estudo (T0), uma semana após a destarização supragengival com ultrassons (T1) e oito semanas após raspagem subgengival e alisamento radicular (T2). A maioria dos peptídeos dos pacientes exibiu uma tendência de diminuição da linha de base pré-tratamento para o pós-tratamento. A análise de agrupamento e gráficos de dispersão com esses peptídeos indicou que o peptidoma tem uma capacidade aceitável de refletir o status da periodontite generalizada estágio I/II. Sete desses peptídeos foram identificados com sucesso como α -1-antitripsina, variável imunoglobulina κ 4-1, haptoglobina e imunoglobulina pesada constante γ 2. Os resultados destacam a diminuição de certos peptídeos no GCF após o tratamento periodontal não cirúrgico. A análise peptidômica direta do sedimento do GCF por MALDI-TOF MS identificou 12 biomarcadores proteicos potenciais, incluindo 5 proteínas microbianas e 7 proteínas humanas, refletindo componentes da composição microbiana e da resposta do hospedeiro relacionados à etiologia da periodontite (40).

A pesquisa em peptidômica é um segmento particularmente intrigante e complexo da proteômica. O peptidoma do GCF pode ser extremamente valioso na identificação de novos biomarcadores para doenças periodontais. Embora métodos extensivos baseados em proteômica de abordagem bottom-up tenham sido aplicados, revelando numerosas proteínas no GCF, esses métodos não conseguem desvendar completamente todos os proteoformas existentes nas amostras. Por outro lado, a

pesquisa em peptidômica emprega principalmente estratégias de perfilagem top-down, que são mais adequadas para a detecção de proteoformas, embora tais estudos sejam escassos. Conseqüentemente, nosso entendimento atual sobre os peptídeos naturalmente ocorrentes e suas funções no GCF permanece incompleto.

4.5 Metaproteômica

A microbiologia e a resposta do hospedeiro são a chave para entender sobre o desenvolvimento da periodontite, entretanto como essa rede complexa de interações acontece no ambiente sulcular necessitamos de mais estudos para sua total compreensão. Durante a colheita do GCF na proteômica, mesmo com o cuidado para não se coletar placa bacteriana, acaba-se por absorver alguns microrganismos e seus subprodutos, mesmo assim temos poucos estudos metaproteômicos ou que reportam esses dados. O primeiro estudo que relatou o micro bioma do GCF humano utilizando tecnologia proteômica identificou 154 proteínas de origem humana, bacteriana e viral em indivíduos saudáveis. A proporção de proteínas derivadas de microrganismos foi maior na doença que em indivíduos saudáveis, especialmente as virais, como por exemplo a proteína vírus herpes 2. O autor relata serem limitados os resultados devido a técnica não ser a mais apropriada para detecção de patógenos periodontais (10). Outros estudos relataram a identificação de proteínas bacterianas, mas não reportaram mais dados relevantes (11, 16, 35).

Baliban e colaboradores propôs 3 proteínas bacterianas, Chaperonina de 33 kDa, transferase de succinil-CoA e uma carboxilase de ribulose bisfosfato, encontradas em todos os modelos de estudo. Foram sugeridas como novos candidatos a biomarcadores para condições periodontais que requerem investigação adicional (12). Em estudo de gengivite experimental, Baliban e colaboradores encontraram 14 proteínas bacterianas, originárias de espécies como *Streptococcus oralis*, *Prevotella oralis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Além disso, foram identificadas 12 proteínas fúngicas e 7 proteínas de leveduras, principalmente de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (16). Carneiro e colaboradores relataram 16 bacterianas que foram significativamente mais expressas na periodontite. Além disso, a interação

entre proteínas humanas e bacterianas e o mecanismo relacionado à periodontite não foram ilustrados (20).

Yi e colaboradores identificaram 12 proteínas potenciais para biomarcadores no diagnóstico de periodontite, incluindo 5 proteínas microbianas e 7 humanas. Os biomarcadores de proteínas microbianas foram expressos por *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Neisseria meningitidis* e *Leptotrichia hofstadii*, que foram principalmente proteínas ribossomais de grande abundância em microrganismos. Nesse trabalho foi utilizada a sedimentação para a extração das proteínas microbianas ao invés do GCF completo para evitar a interferência de proteínas do soro de grande abundância. Eles também encontraram uma grande variedade de microrganismos relacionados com a doença, ao invés do clássico “complexo vermelho”, mostrando que diversas bactérias participam da disbiose complexa que ocorre na placa bacteriana. Este trabalho revelou a presença de 69 gêneros bacterianos únicos no metaproteoma do GCF, destacando a interação complexa entre proteínas do hospedeiro e bacterianas na manutenção da saúde oral (27).

Xiao e colaboradores realizaram uma análise abrangente do proteoma e metaproteoma do GCF humano, identificando-se um total de 3082 proteínas, das quais 1229 foram derivadas de bactérias, indicando a diversidade microbiana presente no GCF. Entre as descobertas, 69 gêneros bacterianos foram identificados, contribuindo com aproximadamente 4.17% para a abundância total de proteínas no GCF. Os gêneros mais abundantes incluíram *Fusobacterium*, *Corynebacterium* e *Leptotrichia* (26).

Grant e colaboradores 2022 detetaram a presença de apenas 6 proteínas bacterianas e 264 proteínas humanas no GCF. Afirma que apesar da busca na base de dados pelas proteínas bacterianas, o número baixo provavelmente se deve ao método de centrifugação prévio a digestão, que removeu essas proteínas (29).

Recentemente, Xiao et al. detetaram a presença de 752 proteínas bacterianas em seu estudo. Foi relatado uma proporção menor de proteínas bacterianas no grupo doente que no grupo controle com padrões de espécies bacterianas mais prevalentes diferentes. Além disso, o presente estudo descreve a rede de interação entre o microbioma e o hospedeiro, onde na periodontite, a maioria das bactérias elevadas se mostraram correlacionadas positivamente com proteínas inflamatórias. Ele

destacou que proteínas microbianas relacionadas com o metabolismo do butirato se mostraram elevadas e podem estar relacionadas com a inflamação periodontal. O butirato se mostrou um importante fator de virulência de bactérias anaeróbias como a *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, que pode destruir junções intercelulares e desencadear a morte celular de células epiteliais gengivais (33).

A interação entre proteínas humanas e bacterianas e o mecanismo relacionado à periodontite ainda não foi totalmente elucidado e o estudo metaproteômico pode ser o caminho para elucidar essa complexa relação.

4.6 Desafios e prospeções futuras

O vasto número de possíveis biomarcadores, alguns já descritos e outros ainda a serem identificados, torna esse campo de grande potencial para novas descobertas. Além da detecção de biomarcadores específicos é importante o entendimento da rede complexa de proteínas que participam da cascata que envolve a perda óssea e de inserção nos tecidos periodontais.

A definição do perfil de proteínas baseada em espectrometria de massa do GCF pode desempenhar um papel fundamental tanto no diagnóstico quanto na prognose de distúrbios sistêmicos importantes. Tecnologias como MALDI-TOF MS e LC-MS/MS são essenciais para explorar eventos moleculares na patogênese oral de doenças, particularmente na periodontite, embora seu papel na detecção de suscetibilidade ainda seja limitado. À medida que a biologia celular avança, espera-se que essas percepções fomentem tratamentos inovadores que abordem uma gama de doenças humanas e esclareçam os mecanismos complexos envolvidos.

Cada biomarcador identificado pode ser validado por métodos bioquímicos tradicionais, como análise por Western blot ou ensaios ELISA, que se beneficiam da alta especificidade dos anticorpos desenvolvidos contra os peptídeos identificados por MS. Essa abordagem poderia facilitar o reconhecimento de padrões fenotípicos específicos que indicam o início e a progressão de doenças periodontais. Além disso, ampliar a cobertura do peptidoma e proteoma do GCF poderia melhorar nosso entendimento dos mecanismos moleculares que desenvolvem a periodontite.

Embora esta revisão se concentre principalmente em doenças periodontais, proposições recentes sugerem que tanto o GCF quanto a saliva devem ser considerados em contextos mais amplos de saúde oral e sistêmica. A facilidade de coleta de saliva por profissionais não médicos dentistas a torna uma ferramenta interessante no diagnóstico de doenças sistêmicas em larga escala. Embora o GCF e a saliva tenham origens diferentes e não se sobreponham perfeitamente como ferramentas diagnósticas, a utilização de ambas em momentos terapêuticos diferentes pode ser utilizada se houver a definição quantitativa de biomarcadores específicos.

Um desafio significativo neste campo é a falta de procedimentos padronizados pré-analíticos e analíticos, o que afeta desde a coleta de amostras até o armazenamento do GCF, a normalização das concentrações de proteínas e a confiabilidade da análise por MS. A variabilidade em como as amostras são coletadas, manipuladas e armazenadas leva a resultados que são difíceis de comparar e interpretar corretamente. Más interpretações dos dados, como visto com defensinas e calgranulinas, exemplificam esses problemas. Uma padronização adequada poderia permitir que a perfilagem por MS capturasse de forma eficaz assinaturas de peptídeos intactos do GCF, auxiliando na identificação das etapas nuances da inflamação gengival.

Na economia atual, onde os custos de saúde são uma preocupação significativa, é crucial basear a prevenção e o tratamento de doenças periodontais em diagnósticos precisos, de baixo custo, mitigando fatores de risco e gerenciando riscos de forma eficaz. O GCF está sendo cada vez mais utilizado para fornecer diagnósticos precisos e específicos do local, que são vitais para o planejamento de tratamento e o monitoramento da doença.

5. CONCLUSÃO

Com base no estudo proteômico do fluido gengival a conclusão emergente é que determinadas proteínas ou um conjunto delas, exibem potencial para serem utilizadas como marcadores preditivos de atividade de doenças periodontais. Esses biomarcadores podem estar relacionados a diversos aspectos da doença, incluindo a

resposta imunológica do hospedeiro, a degradação tecidual, ou serem subprodutos de atividades microbianas. No entanto, a aplicação prática dessas descobertas ainda enfrenta obstáculos significativos. Principalmente, falta uma metodologia analítica que seja facilmente integrável à rotina clínica, o que permitiria a realização de estudos em larga escala de forma mais viável e acessível. Portanto, o desenvolvimento de técnicas de análise proteômica que sejam tanto eficazes quanto práticas para uso clínico diário é crucial para avançar nesta área. Tal avanço não apenas facilitaria estudos mais amplos e detalhados sobre biomarcadores no fluido gengival, mas também poderia transformar significativamente o diagnóstico e a monitorização das doenças periodontais, promovendo uma abordagem mais preventiva e personalizada no tratamento dessas condições.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Ferreira MC, Dias-Pereira AC, Branco-de-Almeida LS, Martins CC, Paiva SM. Impact of periodontal disease on quality of life: a systematic review. *J Periodontol Res.* 2017;52(4):651-665. doi:10.1111/jre.12436
2. Arigbede AO, Babatope BO, Bamidele MK. Periodontitis and systemic diseases: A literature review. *J Indian Soc Periodontol.* 2012;16(4):487-491. doi:10.4103/0972-124X.106878
3. Zhang L, Henson BS, Camargo PM, Wong DT. The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2009;51:25-37. doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00315.x
4. Khurshid Z, Mali M, Naseem M, Najeeb S, Zafar MS. Human Gingival Crevicular Fluids (GCF) Proteomics: An Overview. *Dent J (Basel).* 2017;5(1):12. Published 2017 Feb 22. doi:10.3390/dj5010012
5. Tsuchida S, Satoh M, Takiwaki M, Nomura F. Current Status of Proteomic Technologies for Discovering and Identifying Gingival Crevicular Fluid Biomarkers for Periodontal Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;20(1):86. Published 2018 Dec 26. doi:10.3390/ijms20010086
6. Sorsa T, Gursoy UK, Nwhator S, Hernandez M, Tervahartiala T, Leppilahti J, et al. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival

- crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2016;70(1):142-63.
7. Bostanci N, Belibasakis GN. Precision periodontal care: from omics discoveries to chairside diagnostics. *Clin Oral Investig*. 2023;27(3):971-978. doi:10.1007/s00784-023-04878-7
 8. Barros SP, Williams R, Offenbacher S, Morelli T. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontol 2000*. 2016;70(1):53-64. doi:10.1111/prd.12107
 9. Bostanci N, Heywood W, Mills K, Parkar M, Nibali L, Donos N. Application of label-free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MS E (gingival exudatome). *J Proteome Res*. 2010;9(5):2191-2199. doi:10.1021/pr900941z
 10. Grant MM, Creese AJ, Barr G, 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):4732-4744. doi:10.1021/pr100446f
 11. Choi YJ, Heo SH, Lee JM, Cho JY. Identification of azurocidin as a potential periodontitis biomarker by a proteomic analysis of gingival crevicular fluid. *Proteome Sci*. 2011;9:42. Published 2011 Jul 28. doi:10.1186/1477-5956-9-42
 12. Baliban RC, Sakellari D, Li Z, DiMaggio PA, Garcia BA, Floudas CA. Novel protein identification methods for biomarker discovery via a proteomic analysis of periodontally healthy and diseased gingival crevicular fluid samples. *J Clin Periodontol*. 2012;39(3):203-212. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01805.x
 13. Carneiro LG, Venuleo C, Oppenheim FG, Salih E. Proteome data set of human gingival crevicular fluid from healthy periodontium sites by multidimensional protein separation and mass spectrometry. *J Periodontal Res*. 2012;47(2):248-262. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01429.x
 14. Kido J, Bando M, Hiroshima Y, et al. Analysis of proteins in human gingival crevicular fluid by mass spectrometry. *J Periodontal Res*. 2012;47(4):488-499. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01458.x
 15. Tsuchida S, Satoh M, Umemura H, et al. Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel periodontal disease markers. *Proteomics*. 2012;12(13):2190-2202. doi:10.1002/pmic.201100655

16. Baliban RC, Sakellari D, Li Z, Guzman YA, Garcia BA, Floudas CA. Discovery of biomarker combinations that predict periodontal health or disease with high accuracy from GCF samples based on high-throughput proteomic analysis and mixed-integer linear optimization. *J Clin Periodontol*. 2013;40(2):131-139. doi:10.1111/jcpe.12037
17. Bostanci N, Ramberg P, Wahlander Å, et al. Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in experimental gingivitis. *J Proteome Res*. 2013;12(2):657-678. doi:10.1021/pr300761e
18. Silva-Boghossian CM, Colombo AP, Tanaka M, Rayo C, Xiao Y, Siqueira WL. Quantitative proteomic analysis of gingival crevicular fluid in different periodontal conditions. *PLoS One*. 2013;8(10):e75898. Published 2013 Oct 1. doi:10.1371/journal.pone.0075898
19. Tsuchida S, Satoh M, Kawashima Y, et al. Application of quantitative proteomic analysis using tandem mass tags for discovery and identification of novel biomarkers in periodontal disease. *Proteomics*. 2013;13(15):2339-2350. doi:10.1002/pmic.201200510
20. Carneiro LG, Nouh H, Salih E. Quantitative gingival crevicular fluid proteome in health and periodontal disease using stable isotope chemistries and mass spectrometry. *J Clin Periodontol*. 2014;41(8):733-747. doi:10.1111/jcpe.12262
21. Huynh AH, Veith PD, McGregor NR, et al. Gingival crevicular fluid proteomes in health, gingivitis and chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2015;50(5):637-649. doi:10.1111/jre.12244
22. Batschkus S, Cingoz G, Urlaub H, et al. A new albumin-depletion strategy improves proteomic research of gingival crevicular fluid from periodontitis patients. *Clin Oral Investig*. 2018;22(3):1375-1384. doi:10.1007/s00784-017-2213-0
23. Guzman YA, Sakellari D, Papadimitriou K, Floudas CA. High-throughput proteomic analysis of candidate biomarker changes in gingival crevicular fluid after treatment of chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2018;53(5):853-860. doi:10.1111/jre.12575
24. Marinho MC, Pacheco ABF, Costa GCV, Ortiz ND, Zajdenverg L, Sansone C. Quantitative gingival crevicular fluid proteome in type 2 diabetes mellitus and chronic periodontitis. *Oral Dis*. 2019;25(2):588-595. doi:10.1111/odi.12996

25. Kim JS, Cho IH, Kim KH, Hwang YS. Identification of galectin-10 as a biomarker for periodontitis based on proteomic analysis of gingival crevicular fluid. *Mol Med Rep.* 2021;23(2):123. doi:10.3892/mmr.2020.11762
26. Xiao X, Song T, Xiao X, et al. A qualitative and quantitative analysis of the human gingival crevicular fluid proteome and metaproteome. *Proteomics.* 2021;21(20):e2000321. doi:10.1002/pmic.202000321
27. Yi J, Shen Y, Yang Y, et al. Direct MALDI-TOF profiling of gingival crevicular fluid sediments for periodontitis diagnosis. *Talanta.* 2021;225:121956. doi:10.1016/j.talanta.2020.121956
28. Bellei E, Bertoldi C, Monari E, Bergamini S. Proteomics Disclose the Potential of Gingival Crevicular Fluid (GCF) as a Source of Biomarkers for Severe Periodontitis. *Materials (Basel).* 2022 Mar 15;15(6):2161. doi:10.3390/ma15062161
29. Grant MM, Taylor JJ, Jaedicke K, et al. Discovery, validation, and diagnostic ability of multiple protein-based biomarkers in saliva and gingival crevicular fluid to distinguish between health and periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2022;49(7):622-632. doi:10.1111/jcpe.13630
30. Zhang X, Xiao X, Mu Y, et al. A comparative proteomic analysis to define the influencing factors on gingival crevicular fluid using LC-MS/MS. *J Proteomics.* 2022;252:104421. doi:10.1016/j.jprot.2021.104421
31. Lee J, Chang DS, Kim J, Hwang YS. Alpha-Defensin 1: An Emerging Periodontitis Biomarker. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(13):2143. Published 2023 Jun 22. doi:10.3390/diagnostics13132143
32. Torres A, Michea MA, Végvári Á, et al. Proteomic profile of human gingival crevicular fluid reveals specific biological and molecular processes during clinical progression of periodontitis. *J Periodontal Res.* 2023;58(5):1061-1081. doi:10.1111/jre.13169
33. Xiao X, Xiao X, Liu Y, et al. Metaproteomics Characterizes the Human Gingival Crevicular Fluid Microbiome Function in Periodontitis. *J Proteome Res.* 2023;22(7):2411-2420. doi:10.1021/acs.jproteome.3c00143
34. Ngo LH, Veith PD, Chen YY, Chen D, Darby IB, Reynolds EC. Mass spectrometric analyses of peptides and proteins in human gingival crevicular fluid. *J Proteome Res.* 2010;9(4):1683-1693. doi:10.1021/pr900775s

35. Ngo LH, Darby IB, Veith PD, Locke AG, Reynolds EC. Mass spectrometric analysis of gingival crevicular fluid biomarkers can predict periodontal disease progression. *J Periodontal Res.* 2013;48(3):331-341. doi:10.1111/jre.12012
36. Preianò M, Falcone D, Maggisano G, et al. Assessment of pre-analytical and analytical variables affecting peptidome profiling of gingival crevicular fluid by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 2014;437:120-128. doi:10.1016/j.cca.2014.07.022
37. Preianò M, Maggisano G, Lombardo N, et al. Influence of storage conditions on MALDI-TOF MS profiling of gingival crevicular fluid: Implications on the role of S100A8 and S100A9 for clinical and proteomic based diagnostic investigations. *Proteomics.* 2016;16(6):1033-1045. doi:10.1002/pmic.201500328
38. Preianò M, Maggisano G, Murfunì MS, et al. An Analytical Method for Assessing Optimal Storage Conditions of Gingival Crevicular Fluid and Disclosing a Peptide Biomarker Signature of Gingivitis by MALDI-TOF MS. *Proteomics Clin Appl.* 2018;12(5):e1800005. doi:10.1002/prca.201800005
39. Antezack A, Chaudet H, Tissot-Dupont H, Brouqui P, Monnet-Corti V. Rapid diagnosis of periodontitis, a feasibility study using MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One.* 2020;15(3):e0230334. Published 2020 Mar 13. doi:10.1371/journal.pone.0230334
40. Yuan C, Ma Z, Tong P, et al. Peptidomic changes of saliva after non-surgical treatment of stage I/II generalized periodontitis. *Oral Dis.* 2022;28(6):1640-1651. doi:10.1111/odi.13838
41. Bostanci N, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid and its immune mediators in the proteomic era. *Periodontol 2000.* 2018;76(1):68-84. doi:10.1111/prd.12154
42. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human body fluid proteome analysis. *Proteomics.* 2006;6(23):6326-6353. doi:10.1002/pmic.200600284
43. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, et al. Targeting the association of calgranulin B (S100A9) with insulin resistance and type 2 diabetes [published correction appears in *J Mol Med (Berl)*. 2013 Apr;91(4):535. Serino, Matteo [added]]. *J Mol Med (Berl)*. 2013;91(4):523-534. doi:10.1007/s00109-012-0979-8

44. Chen YS, Yan W, Geczy CL, Brown MA, Thomas R. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S100 proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(2):R39. doi:10.1186/ar2645
45. Rumman N, Sultan M, El-Chammas K, Goh V, Salzman N, Quintero D, Werlin S. Calprotectin in cystic fibrosis. *BMC Pediatr.* 2014 May 29;14:133. doi: 10.1186/1471-2431-14-133.
46. Carnazzo V, Redi S, Basile V, et al. Calprotectin: two sides of the same coin. *Rheumatology (Oxford).* 2024;63(1):26-33. doi:10.1093/rheumatology/kead405
47. Que ML, Andersen E, Mombelli A. Myeloid-related protein (MRP)8/14 (calprotectin) and its subunits MRP8 and MRP14 in plaque-induced early gingival inflammation. *J Clin Periodontol.* 2004;31(11):978-984. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00594.x