UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM PERIODONTIA

CRISTINE D'ALMEIDA BORGES

Identificação de sítios periodontais em progressão
e marcadores moleculares da atividade da doença

PG.PERIO
FORP-USP

Ribeirão Preto
2014

CRISTINE D'ALMEIDA BORGES

**Identificação de sítios periodontais em progressão
e marcadores moleculares da atividade da doença**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Profº. Drº. Mário Taba Jr.

Ribeirão Preto

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Borges. Cristine D'Almeida Borges

Identificação de sítios periodontais em progressão e marcadores moleculares da atividade da doença

93p. il. 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Taba Jr. Mário Taba Jr.

Identificação de sítios periodontais em progressão e marcadores moleculares da atividade da doença

Folha de Aprovação

Cristine D'Almeida Borges

Identificação de sítios periodontais em progressão e marcadores moleculares da atividade da doença

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Periodontia.

Aprovado em: ____/____/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Celso e Virgínia, pela educação, amor e incentivo infinitos. Sempre serão meus exemplos de vida e sempre terei orgulho de tê-los como pais. Ao meu irmão, Afonso Jr., pelo apoio e amizade fortalecida, mesmo de longe.

Às minhas avós, Eliesete e Gabi (*in memoriam*), pelo exemplo de liderança familiar e incentivo, eternamente.

Ao meu noivo, Vagner, pelo apoio, amor e por se fazer sempre presente, mesmo estando longe.

Agradecimentos

A Deus, por me dar saúde e força de vontade para alcançar meus planejamentos, pela bela família que tenho e os melhores amigos que eu poderia ter.

Ao Prof. Mário Taba Jr., pela orientação, paciência e confiança em meu trabalho. Pelos ensinamentos e reuniões agradáveis com o grupo. Levarei comigo sempre. Muito obrigada.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Periodontia. Cada um com suas qualidades que servem de exemplo a ser alcançado na profissão.

Aos amigos da turma do Mestrado, André, Túlio, Felipe e Kelly, pelas alegrias, momentos de muita risada e aprendizados na rotina clínica. Em especial, Mariana e Paula, melhores amigas e irmãs que me fizeram esquecer de que estava longe de casa.

Aos amigos da turma do Doutorado, Carol Delmondes, Carol Mandetta, Umberto, Gustavo, Patrícia, Lu Maia e Danilo, que completaram a família da pós-graduação.

À Vivi, que sempre me ajudou e me ensinou com muita calma, nas horas que eu sempre achei que não fosse conseguir. Serei muito grata e sempre estarei torcendo pelo melhor.

À Milla, técnica do Laboratório de Biologia Molecular, por tudo o que me ensinou em tão pouco tempo. Foram ótimos momentos na correria de laboratório.

Às secretárias do Departamento, Tati, Dulce e Dani, pela educação e disposição durante projeto.

Às funcionárias da clínica, Dani e Sueli, pela alegria na rotina de clínica e pelas palavras incentivadoras.

Resumo

BORGES, CD. **Identificação de sítios periodontais em progressão e marcadores moleculares da atividade da doença.** Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A periodontite é uma doença infecciosa caracterizada pela inflamação dos tecidos de suporte dos dentes, perda de inserção e perda óssea. O diagnóstico convencional da periodontite é realizado por meio da avaliação dos parâmetros clínicos e radiográficos. Entretanto, novas modalidades diagnósticas para identificação do início e progressão da periodontite estão sendo estudadas, o que possibilitaria o diagnóstico precoce da progressão da doença, assim como avaliação da resposta ao tratamento periodontal. Este estudo se propôs a monitorar a atividade da doença periodontal e descrever as características clínicas e moleculares de sítios periodontais ativos em progressão em pacientes com periodontite crônica, a partir da avaliação da expressão gênica de sítios periodontais e da avaliação de proteínas inflamatórias salivares e do fluido gengival crevicular, antes e após a terapia periodontal básica. Foram selecionados 27 indivíduos e classificados em dois grupos: grupo Controle (n=9) - pacientes saudáveis; grupo DP (n=18) – pacientes com periodontite crônica. O exame clínico foi realizado por um único examinador experiente em três tempos: (i) quinze dias antes da terapia periodontal, (ii) no dia da terapia periodontal e (iii) 60 dias após a terapia periodontal. A coleta de fluido gengival foi realizada no baseline, 15 e 60 dias após a terapia; a coleta de saliva foi realizada no baseline e 60 dias após a terapia e a coleta de tecido gengival apenas no baseline. Para a coleta de fluido gengival e tecido gengival, os sítios foram classificados em: sítios com inflamação (PS $\geq$ 5 mm e presença de sangramento à sondagem nos dois exames clínicos iniciais); sítios sem inflamação (PS $\leq$ 3 mm e ausência de sangramento à sondagem nos dois exames clínicos iniciais); e sítios controle (PS $\leq$ 3 mm e ausência de sangramento à sondagem). Os sítios com e sem inflamação pertenciam ao mesmo paciente do grupo DP. A análise de expressão gênica de VEGF, MMP-8, IL-10, RANK-L, OPG e TGF- β_1 foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR). As análises de marcadores na saliva e fluido gengival foram realizadas pelo imunoensaio *Multiplex Cytokine Profiling*, exceto para MMP-8 que foi feito através do método ELISA. Os sítios com inflamação apresentaram maior expressão de RANK-L, OPG, IL-10 e TGF- β_1 ($p < 0,05$) e maior quantidade (pg) de VEGF ($p=0,009$) e IL-10 ($p < 0,05$) no fluido gengival. Os pacientes do grupo DP apresentaram maior quantidade (pg) de RANK-L ($p=0,03$) e OPG ($p=0,0002$) na saliva, antes da terapia. A atividade da doença em sítios periodontais a após terapia básica é um evento de baixa ocorrência, mas apenas uma pequena fração dos sítios permaneceu com perda de inserção progressiva. Os biomarcadores utilizados neste estudo podem ser úteis para detectar inflamação, mas não para identificar sítios ativos em progressão.

Palavras-chave: Doença Periodontal, Perda de inserção; Biomarcadores.

Abstract

BORGES, CD. **Identification of progressive periodontal sites and molecular markers of disease activity.** Dissertação (Mestrado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Periodontal disease is a chronic microbial infection characterized by inflammation of supportive tissues and alveolar bone loss. Because of the increasing prevalence of the disease, diagnostic modalities for the early identification of periodontitis initiation and progression are being studied. Cytokines associated to host defense has been identified in saliva, gingival crevicular fluids and gingival tissues of periodontal patients. In this study, we aimed to monitor periodontal disease activity and investigate clinical and molecular features of active sites through saliva, gingival crevicular fluid and gingival tissue samples. Fifty-seven subjects were enrolled for this study, 18 with chronic periodontitis (PD group) and 9 subjects that were periodontal and systemically healthy (control group). The patients underwent clinical examination and collection of saliva before and two months after the non-surgical periodontal therapy; collection of gingival crevicular fluid at baseline, 15 days and 2 months after therapy; and collection of gingival tissue samples at baseline. For collection of gingival crevicular fluid and gingival tissue samples, sites were classified as: inflamed (probing depth ≥ 5 mm and bleeding on probe); non-inflamed (probing depth ≤ 3 mm without bleeding on probe); and control sites (probing depth ≤ 3 mm without bleeding on probe from control group). Inflamed and non-inflamed sites belongs to the same patient PD group. Samples of whole saliva were collected for assessment of the levels of MMP-8, VEGF, IL-10, RANKL, OPG and TGF- β_1 using the multiplex cytokine profiling assay. Samples of gingival crevicular fluid were collected for assessment of the levels of MMP-8, VEGF and IL-10 using the multiplex cytokine profiling assay, except for MMP-8 (ELISA assay). Inflamed and non-inflamed lesion in each patient underwent biopsy for the Real Time PCR gene expression analysis for MMP-8, VEGF, IL-10, RANKL, OPG and TGF- β_1 . At baseline, higher expression of mRNA for RANK-L, OPG, IL-10 e TGF- β_1 were found in inflamed sites ($p < 0.05$) and higher total amount of IL-10 (0,29 pg/sample) compared to non-inflamed (0,21 pg/sample) and control sites (0.21 pg/sample) ($p < 0.05$). 15 days after therapy, total amount of VEGF were higher in inflamed sites (11.43 pg/sample), compared to non-inflamed sites (7.38 pg/sample) ($p=0.009$). PD group showed higher total amount (pg) of RANKL ($p=0.03$) and OPG ($p=0.0002$) after periodontal therapy. Thus, we concluded that disease activity seems to be an event of relative low probability of occurrence, however, a small percentage of sites keeps showing progressive attachment loss even after basic periodontal therapy. The specific biomarkers used in this study may be helpful to detect inflammation but not to discriminate progressive active sites.

Key words: attachment loss, periodontal, biomarkers.

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

%: porcentagem

°C: grau Celsius

µg: micrograma

ACTB: beta-actina

Aids: Acquired immune deficiency syndrome

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

Ct: ciclo limiar (cycle threshold)

DP: pacientes com periodontite crônica

ELISA: ensaio imunoenzimático

IL: interleucina

IP: índice de placa

ISG: Índice de sangramento gengival

mg: miligrama

min.: minuto

ml: mililitro

mm: milímetro

MMP: metaloproteinase da matriz

n: número

n. dentes: número de dentes

NICR: nível clínico de inserção relativo

OPG: osteoprotegerina

PE: ficoeritrina

pg: picograma

PS: profundidade de sondagem

PS ≤ 3: profundidade de sondagem ≤ 3 mm

PS 4-6: profundidade de sondagem entre 4 e 6 mm

PS ≥ 7: profundidade de sondagem ≥ 7 mm

r: valor de correlação

RANKL: ligante do receptor ativador do fator kappa B nuclear

RNA: ácido ribonucléico

RNAse: enzima ribonuclease

SS: sangramento à sondagem

seg.: segundo

TGF- β_1 : Fator de Crescimento Transformador beta 1

VEGF: Fator de Crescimento Vascular Endotelial

Sumário

1 Justificativa.....	12
2 Introdução.....	15
3 Proposição.....	20
4 Material e Métodos	22
4.1 Seleção dos pacientes	23
4.2 Exame Clínico Periodontal	24
4.3 Coleta de saliva	25
4.4 Coleta do fluido gengival	25
4.5 Terapia periodontal básica	25
4.6 Determinação da Atividade da doença e sítios ativos	26
4.7 Coleta do tecido gengival (biópsia)	26
4.8 Extração de RNA.....	26
4.9 Síntese de cDNA.....	27
4.10 Análise da expressão gênica.....	27
4.11 Preparo das amostras de fluido gengival e saliva	28
4.12 Análise das proteínas salivares e do fluido gengival	28
4.13 Análise Estatística	29
5 Resultados	31
5.1 Parâmetros clínicos.....	32
5.2 Sítios periodontais	33
5.3 Proteínas Salivares	36
5.4 Proteínas do Fluido gengival	37
5.4.1 Proteínas do Fluido gengival de Sítios Periodontais	39
5.4.2 Atividade de doença X Quantidade total de proteínas do fluido gengival.....	40
5.4.3 Correlações entre parâmetros clínicos e quantidade total de cada proteína....	42
5.5 Análise da expressão gênica.....	43
5.5.1 Comparações entre sítios do grupo Controle e sítios do grupo DP.....	43
5.5.2 Comparações entre sítios com inflamação e sítios sem inflamação	50

5.5.3	Comparações entre categorização da profundidade de sondagem e expressão gênica	53
5.5.4	Correlações entre parâmetros clínicos e expressão relativa	56
6	Discussão	57
7	Conclusão	63
8	Referências Bibliográficas	65
	Artigo.....	73

1 Justificativa

A periodontite é uma doença infecciosa caracterizada pela inflamação dos tecidos de suporte dos dentes, perda de inserção e perda óssea ¹. O diagnóstico convencional da periodontite é realizado por meio da avaliação dos parâmetros clínicos e radiográficos ². Entretanto, novas modalidades diagnósticas para identificação do início e progressão da periodontite estão sendo estudadas, o que possibilitaria o diagnóstico precoce da progressão da doença, assim como avaliação da resposta ao tratamento periodontal ^{3,4}.

As citocinas associadas à defesa do hospedeiro têm sido identificadas na saliva ^{5,6}, fluido gengival ⁷ e tecido gengival coletado em biópsias ^{8,9}. A saliva e o fluido gengival, por serem facilmente coletados através de métodos não invasivos e conterem marcadores locais e sistêmicos da doença ³, podem servir de base para determinação de marcadores de inflamação periodontal. Atualmente, já existem testes salivares para o diagnóstico e a identificação do risco ao desenvolvimento de determinadas doenças sistêmicas como *Aids* e hepatite, bem como na avaliação da atividade de cárie ⁵.

Hernandez *et al.* (2006) avaliaram a presença de MMP-13 em amostras de fluido gengival de pacientes com atividade de doença periodontal destrutiva, do tipo crônica, em sítios ativos e inativos. Determinaram ainda a atividade de MMP-13 presente em lesões com episódios de perda de inserção pelo método ELISA e a expressão de MMP-13 pelo método de Western blot ¹⁰.

Miller *et al* (2006) avaliaram a presença IL-1, MMP-8 e OPG, reforçando a ideia de que existem biomarcadores presentes na saliva específicos para diferentes aspectos da periodontite, como inflamação, degradação de colágeno e remodelamento ósseo, principalmente IL-1 e MMP-8. O autor sugere que estudos devem ser realizados no sentido de confirmar esses biomarcadores na saliva de pacientes com periodontite na fase ativa, para identificar pessoas com susceptibilidade à doença, sítios ativos ou que poderão se tornar ativos, fornecendo pontos-chaves para o monitoramento e terapia futuros ¹¹.

Com base nessa linha de pesquisa, Kumar *et al.* (2006) utilizaram biópsias gengivais para avaliação da expressão de metaloproteinases da matriz (MMP)-8 e -9 em pacientes portadores de periodontite crônica com ou sem Diabetes mellitus pelo método Western blotting ⁷. César-Neto *et al.* (2007) também utilizaram biópsias gengivais para avaliar o efeito do fumo na expressão dos genes de Interleucina (IL)-

1 α , 1ra, -6, -8 e -10, fator de necrose tumoral- α , MMP-2 e -8, ativador de receptor de NF- κ B ligante (RANKL) e osteoprotegerina em sítios com periodontite ⁹.

Apesar dos recentes avanços na identificação de moléculas relacionadas à periodontite, o diagnóstico convencional da doença periodontal ainda não envolve a avaliação laboratorial de biomarcadores relacionados à sua atividade ou dos marcadores de risco da doença. Dessa forma, uma melhor compreensão da atividade e progressão da doença certamente contribuirá para o estabelecimento de abordagens diagnósticas mais específicas e potencialmente mais poderosas.

2 Introdução

A periodontite é uma doença infecciosa caracterizada pela inflamação dos tecidos de suporte dos dentes, perda de inserção e perda óssea. A periodontite crônica é reconhecida como a forma mais frequente da doença, apresentando prevalência e severidade aumentadas com a idade ¹. Porém, também está relacionada a um aumento da exposição aos fatores de risco com o passar dos anos ¹². A presença de irritantes locais está relacionada com a severidade da doença e a taxa de progressão é normalmente baixa ou moderada e pode apresentar períodos de rápida progressão ¹³.

Segundo a teoria da progressão da doença periodontal, a periodontite é uma doença intermitente, com períodos de exacerbação e remissão. Esse modelo de atividade da doença periodontal foi usado para explicar uma aparente variabilidade da progressão da doença observada por meio de parâmetros clínicos. De acordo com a literatura, com base nesse modelo de doença intermitente, sítios periodontais que apresentam um aumento na perda de inserção de 2 a 3 mm são considerados lesões ativas e, ao contrário, o sítio é inativo ¹⁴.

O desequilíbrio entre o biofilme bacteriano e a suscetibilidade do hospedeiro, causa a liberação de mediadores inflamatórios responsáveis pela destruição tecidual ^{5, 15}. Localmente, lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos induzem monócitos, leucócitos polimorfonucleares, neutrófilos, macrófagos e outras células a liberarem toxinas responsáveis pela destruição dos tecidos periodontais ^{5, 16, 17}. Os LPS também estimulam a apoptose induzida pelas células de defesa ¹⁸.

Nesse processo, a apoptose de neutrófilos fornece o sinal para monócitos modificarem seu fenótipo, passando a produzir citocinas antiinflamatórias e a supressão de citocinas pró-inflamatórias ¹⁹. Desta forma, o processo de apoptose parece desempenhar um papel importante na periodontite ^{20, 21}.

A ativação da resposta imune local, basicamente por células T *helper*, pode determinar a estabilidade ou progressão da doença periodontal. Esta resposta imune pode exibir um padrão Th1, em que predominam substâncias pró-inflamatórias, ou um padrão Th2, com características antiinflamatórias ²². A ação das diferentes quimiocinas e citocinas, envolvidas na imunopatogênese da doença periodontal, induzem a migração e a manutenção dos diversos tipos celulares, como leucócitos polimorfonucleares, células NK (natural-killer), células dendríticas, macrófagos e linfócitos no tecido gengival. Estas células participam da reação imune e inflamatória agindo na eliminação do patógeno, na apresentação de antígenos e na produção de

mais citocinas. Esse mecanismo de auto regulação da resposta e recrutamento seletivo dos tipos celulares leva à produção de diferentes citocinas no sítio da resposta, podendo determinar a progressão ou não da doença ²³.

Estas citocinas associadas à defesa do hospedeiro têm sido identificadas na saliva ^{5, 6}, sangue ²⁴, fluido gengival ⁷ e tecido gengival coletado em biópsias ^{8, 9}. Níveis aumentados dessas moléculas podem estar relacionados à condição periodontal, permitindo a identificação e o controle de pacientes com doença periodontal ².

A IL-1 está associada com o recrutamento de células inflamatórias, facilitando a degranulação de neutrófilos, aumento da produção de metaloproteinases (MMPs), inibição da síntese de colágeno e ativação das células T e B ²⁵. O Fator de necrose tumoral α (TNF- α), por sua vez, está envolvido na osteoclastogênese, secreção de MMP e produção de IL-6 ²⁶. Tanto a IL-1 como o TNF- α pode induzir a diferenciação de osteoclastos pela modulação na expressão do receptor ativado de NF- κ B ligante (RANKL) ²⁷.

Em termos moleculares, a reabsorção óssea é regulada pela associação de RANKL e osteoprotegerina (OPG), as quais são moléculas pertencentes à família de receptores do TNF ²⁸. Em termos celulares, RANKL é expresso como ligante secretado por osteoblastos, fibroblastos e células T e B ²⁹, e sua ação osteoclastogênica pode ser bloqueada pela OPG ³⁰. Através da ativação do receptor RANK em precursores de osteoclastos, RANKL pode desencadear a diferenciação em osteoclastos multinucleados, responsáveis pela reabsorção óssea ³¹.

As metaloproteinases, por sua vez, são enzimas proteolíticas que estão envolvidas não só na degradação de proteínas da matriz extracelular, mas também no desenvolvimento embriológico, remodelação tecidual e processos de cicatrização ³². Na doença periodontal, a ativação e a superexpressão de MMP pelo hospedeiro pode ser causada por patógenos periodontais como *Porphyromonas gingivalis* e por citocinas inflamatórias ¹⁰.

A MMP-8 está entre as principais metaloproteinases destrutivas responsáveis pela degradação e remodelação da matriz extracelular. Está relacionada aos parâmetros clínicos e radiográficos da periodontite ³³, assim como foi detectada em fluido gengival, saliva e tecido gengival de pacientes com periodontite ³⁴⁻³⁶. Entretanto, Aiba *et al.* (1996) observaram níveis de MMP-8 mRNA similares em tecidos gengivais com e sem inflamação de pacientes com periodontite ³⁷.

Concomitantemente, outras citocinas com propriedades antiinflamatórias, como a IL-10, atuam limitando a duração e extensão do efeito pró-inflamatório. A IL-10 apresenta função de proteção contra a destruição tecidual, inibindo a ação de MMPs e RANKL, que promovem a diferenciação e ativação de osteoclastos³⁸. Em tecidos inflamados, IL-10 potencializa a resposta autoimune local caracterizando o aumento de células secretoras de anti-colagenase³⁹. Então o desenvolvimento e a regulação de uma resposta imune dependem também de uma série de citocinas⁹.

Dentre os fatores derivados do hospedeiro e relacionados com o início e progressão da gengivite e periodontite, o Fator de Crescimento Transformador-Beta (TGF- β) atua na inflamação e cicatrização tecidual⁴⁰, e é expresso por células gengivais, endotélio vascular e fibroblastos gengivais⁴¹.

Das três isoformas de TGF- β , TGF- β_1 é a mais estudada e apresenta efeitos pró-inflamatórios e antiinflamatórios. Efeitos antiinflamatórios incluem bloqueio da atividade de células NK⁴², modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias e estimula a produção do receptor antagonista de IL-1 que regula atividades antiinflamatórias e imunossupressoras⁴³. Propriedades pró-inflamatórias incluem quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e linfócitos, e estimulação destas células para liberar citocinas pró-inflamatórias⁴⁴. A presença destas duas funções, faz do TGF- β_1 um importante componente na regulação do desenvolvimento e progressão da doença periodontal⁴⁵.

Durante a progressão da periodontite, a vasculatura periodontal é profundamente afetada⁴⁶. Evidências apontam que tecidos inflamados aumentam a expressão de várias citocinas e fatores de crescimento que podem regular a angiogênese^{47, 48}. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é um mediador angiogênico multifuncional⁴⁹ e participa tanto de processos fisiológicos, como de condições patológicas⁵⁰. Porém, estudos sobre o envolvimento do VEGF na patogênese da doença periodontal mostram resultados conflitantes, sugerindo sua expressão aumentada^{47, 48}, diminuída⁵¹ ou inalterada⁵².

Contudo, devido à grande complexidade da doença periodontal e atuação de inúmeras citocinas e fatores de crescimento no início e progressão do processo inflamatório, é altamente improvável que um único biomarcador possa ser utilizado como diagnóstico da doença periodontal. Assim, estudos que avaliem um conjunto de biomarcadores não somente no estado momentâneo da doença periodontal como

também a atividade da doença parece promissor na área do diagnóstico periodontal

53

Métodos de biologia molecular têm proporcionado grandes avanços científicos. Dessa forma, uma melhor compreensão da resposta do hospedeiro e dos mecanismos de defesa envolvidos na doença periodontal certamente contribuirá para o estabelecimento de abordagens terapêuticas mais específicas e potencialmente mais previsíveis.

3 Proposição

Objetivo geral:

Este estudo se propôs a monitorar a atividade da doença periodontal e descrever as características clínicas e moleculares de sítios periodontais ativos em progressão em pacientes com periodontite crônica, a partir da avaliação da expressão gênica de sítios periodontais e da avaliação de proteínas inflamatórias salivares e do fluido gengival crevicular, antes e após a terapia periodontal básica.

Objetivos específicos:

- a) identificar e monitorar sítios com doença periodontal em atividade;
- b) avaliar parâmetros clínicos e moleculares após a terapia periodontal;
- c) avaliar a expressão dos genes IL-10, RANK-L, OPG, TGF- β_1 , MMP-8 e VEGF em sítios com inflamação e sem inflamação por meio da tecnologia do *PCR Real Time*;
- d) avaliar a expressão das proteínas IL-10, RANK-L, OPG, TGF- β_1 , MMP-8 e VEGF na saliva e fluido gengival crevicular, nas condições de saúde e periodontite crônica, por meio da tecnologia do imunoensaio Luminex™ xMAP e ELISA.

4 Material e Métodos

4.1 Seleção dos pacientes

Este estudo foi conduzido em conjunto com o Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia e a Secretaria de Saúde de Ribeirão Preto, mediante autorização de acordo com o Processo Administrativo 02 2013 027925 7. E foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, nº 02841912.0.0000.5419.

Todos os pacientes selecionados procuraram tratamento periodontal na Clínica de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e nas Unidades Básicas de Saúde de Ribeirão Preto. Os pacientes foram convidados a participar do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Foram fornecidas informações sobre os objetivos, riscos e benefícios do estudo para cada participante.

O estudo incluiu pacientes com, no mínimo, 14 dentes naturais, sendo 10 deles posteriores. Os pacientes com periodontite crônica (grupo DP) apresentaram, pelo menos, cinco dentes com profundidade de sondagem (PS) $\geq 5\text{mm}$ e perda de inserção $\geq 3\text{ mm}$ ¹⁰. Pacientes do grupo controle apresentaram PS $\leq 3\text{ mm}$ em todos os dentes e índice de placa e sangramento $\leq 20\%$, com alguma indicação de cirurgia estética ou exodontia.

Foram excluídos os pacientes que apresentavam alguma inflamação crônica ou condição imunológica, como artrite, história de tabagismo, gravidez, e uso de medicação como antiinflamatórios, antibióticos, imunossupressores, ou anticoagulantes.

Após a triagem, foram selecionados 32 indivíduos, dos quais 5 foram eliminados porque não terminaram o tratamento. Os 27 pacientes foram classificados em dois grupos:

grupo Controle (n=9) - pacientes saudáveis periodontal e sistemicamente;

grupo DP (n=18) - pacientes sistemicamente saudáveis e clinicamente com diagnóstico de periodontite crônica de acordo com a classificação atual das doenças periodontais¹³.

O seguinte desenho experimental foi proposto neste estudo:

4.2 Exame Clínico Periodontal

O exame clínico foi realizado por um único examinador experiente em três tempos: (i) quinze dias antes da terapia periodontal, (ii) no dia da terapia periodontal e (iii) 60 dias após a terapia periodontal. Os parâmetros clínicos foram avaliados em seis sítios por dente (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual).

O estado de higiene bucal foi analisado pelo índice de placa (IP), onde depósitos de biofilme dental foram observados (sem corante) sobre as quatro superfícies de cada dente (vestibular, mesial, distal e lingual). A presença de biofilme dental foi avaliada dicotomicamente⁵⁴. Concomitantemente a esse procedimento os pacientes receberam instruções de higiene oral, incluindo a técnica de escovação, uso de fio dental e escova interdental.

A profundidade de sondagem foi medida a partir da margem gengival até o fundo da bolsa, através da sonda periodontal computadorizada* com a ponta tipo *pocket*. O nível clínico de inserção relativo foi mensurado da superfície oclusal/incisal até o fundo da bolsa através da sonda periodontal computadorizada com a ponta *disk*.

A presença do sangramento e supuração foi considerada positiva quando ocorrida em até vinte segundos após a inserção da sonda para medida da profundidade de sondagem. O nível ósseo foi avaliado radiograficamente.

Para a coleta de fluido gengival e tecido gengival, os sítios foram classificados em: sítios com inflamação (PS $\geq$ 5 mm e presença de sangramento à sondagem nos

* Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA

dois exames clínicos iniciais); sítios sem inflamação ($PS \leq 3$ mm e ausência de sangramento à sondagem nos dois exames clínicos iniciais); e sítios controle ($PS \leq 3$ mm e ausência de sangramento à sondagem). Os sítios com e sem inflamação pertenciam ao mesmo paciente do grupo DP.

4.3 Coleta de saliva

Amostras de saliva total não estimulada foram coletadas de cada paciente⁵⁵ em tubos estéreis antes e 60 dias após a terapia periodontal básica. Os pacientes foram orientados a não ingerirem alimentos, beberem ou realizarem higiene oral por, pelo menos, 1 hora antes da coleta da saliva. As amostras de saliva foram colocadas imediatamente no gelo e aliquotadas antes do congelamento a -80°C .

4.4 Coleta do fluido gengival

A coleta de fluido gengival foi realizada em todos os pacientes, previamente a terapia periodontal, bem como em 15 e 60 dias após a terapia. Nos pacientes do grupo DP, foram coletadas amostras de fluido gengival de três sítios com inflamação e um sítio sem inflamação. Nos pacientes do grupo Controle, o fluido gengival foi coletado de um sítio com $PS \leq 3$ mm e ausência de sangramento à sondagem.

Em cada indivíduo, após o sítio ser isolado com rolinhos de algodão, o biofilme supragengival foi gentilmente removido com curetas e a superfície seca com gaze. Após isso, o fluido gengival foi coletado em tiras de papel absorvente^{*}, que foram inseridas no sulco gengival do sítio escolhido e mantidas por 30 segundos, sendo então retiradas e transferidas para um tubo de Eppendorf. Após 3 minutos o procedimento de coleta foi repetido para a obtenção de uma nova tira, até totalizar 3 tiras de papel absorvente por sítio. Tiras contaminadas por sangue ou saliva foram descartadas. As amostras foram estocadas a -80°C .

4.5 Terapia periodontal básica

A terapia periodontal básica foi realizada por meio de raspagem e alisamento radicular e instrução de higiene oral acompanhada de profilaxias quinzenais. A

^{*} Periopaper®, Ora Flow, New York, USA

raspagem e alisamento radicular foi realizada em um intervalo de até 48 horas⁵⁶, com aparelho de ultrassom* e com curetas tipo Gracey†, com o auxílio de anestesia local nas áreas de raspagem subgengival, se necessário. Os pacientes retornaram duas semanas após o procedimento para nova instrução de higiene oral e início do controle do biofilme.

4.6 Determinação da Atividade da doença e sítios ativos

O diagnóstico da atividade da doença foi baseada no método de tolerância⁵⁷. Os sítios considerados ativos foram os que apresentaram perda de inserção $\geq 1\text{mm}$ (considerando 3 vezes o desvio padrão da margem de erro de 0,3mm da sonda eletrônica) após dois meses do exame inicial. Os sítios inativos foram definidos como aqueles com PS equivalente aos sítios ativos, mas sem perda de inserção durante o mesmo período.

4.7 Coleta do tecido gengival (biópsia)

Amostras de tecido gengival (tecido epitelial e conjuntivo) foram obtidas de um sítio com inflamação e um sem inflamação, do mesmo paciente do grupo DP. Para as amostras do grupo Controle, cirurgias com finalidade estética de áreas sem sinal de doença periodontal ou inflamação, quando indicadas, foram biopsiadas. Todas as amostras foram coletadas previamente a terapia periodontal básica. Após a coleta, as amostras foram colocadas imediatamente em nitrogênio líquido e depois foram conservadas a -80°C para posteriormente serem submetidas à extração de RNA total e análise de expressão gênica.

4.8 Extração de RNA

A extração do RNA das amostras de tecido gengival foi realizada utilizando-se o reagente Trizol‡. Brevemente, cada fragmento de tecido gengival foi macerado em recipiente específico e homogeneizado em reagente Trizol (1 ml/ mg de tecido).

* Cavitron, Dentsply Cavitron, Long Island, NY, USA.

† Hu-Friedy instruments, Chicago, IL, USA.

‡ Trizol® Reagent, Invitrogen, Milan, Italy.

Foram adicionados 250 µl de clorofórmio*, agitado durante 30 segundos e mantido por 5 minutos à temperatura de 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.500 RPM, por 15 minutos, a 4°C.

Após a centrifugação, foram observadas três fases na solução, em que a fase aquosa incolor contendo o RNA foi transferida para outro tubo, acrescida de 250 µl de etanol 95% e homogeneizada. A amostra foi adicionada ao filtro do kit† e centrifugada a 10.500 RPM, por 1 minuto, a 4°C. Após os processos de lavagem do filtro com solução tampão de lavagem para RNA, adição de DNase e, posteriormente, *DNase stop solution*, foram feitas duas eluições para cada amostra com 25 µl de água RNA/DNase free.

A quantificação de RNA foi realizada de acordo com as recomendações do aparelho‡, utilizando 2 µl de cada amostra. As amostras que apresentaram baixa concentração de RNA foram eliminadas.

4.9 Síntese de cDNA

A partir de 1 µg de RNA total foi confeccionada a fita de DNA complementar (cDNA) por uma reação de transcrição reversa§, baseado no protocolo proposto pelo fabricante. Ao final desta reação, o cDNA foi estocado a -20°C até o momento do uso.

4.10 Análise da expressão gênica

Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)

As reações foram realizadas em duplicatas para cada amostra de tecido (sítio com inflamação, sem inflamação e controle). Para cada poço da placa de 96 poços**, foram adicionados: 5 µl de Mix††, 0,5 µl do primer‡‡ para o gene avaliado (IL-10, RANK-L, OPG, MMP-8, VEGF e TGF-β), 2,25 µl de reação de síntese de cDNA e

* Sigma, St Louis, MO, USA.

† SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EUA)

‡ NanoVue Plus, GE Healthcare.

§ RT² First Strand Kit, SABioscience (cód. C03), Frederick, MD, USA.

** MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0.1mL), Applied Biosystems, Life Technologies

†† TaqMan® Fast Advanced Master Mix, Applied Biosystems

‡‡ TaqMan®, Applied Biosystems

2,25 µl de água deionizada. Em seguida, a reação foi executada em um termociclador em tempo real*. Os tempos e as temperaturas utilizados na amplificação dos genes estão descritos na Tabela 1. Após a amplificação das amostras, os cálculos para esta análise foram realizados em relação ao gene constitutivo beta-actina (ACTB).

Tabela 1. Programa do termociclador utilizado na análise da expressão gênica.

	ciclos	duração	temperatura
<i>StepOnePlus™ System</i>	1	02:00 minutos	50°C
		00:20 segundos	95°C
	40	01 segundos	95°C
		20 segundos	60°C

StepOnePlus™ System = nome do termociclador utilizado; ciclos = quantidade de ciclos ocorridos; duração = tempo decorrido em cada ciclo; temperatura = temperatura alcançada durante o ciclo.

4.11 Preparo das amostras de fluido gengival e saliva

Para o preparo das amostras de fluido gengival, foram adicionados 60 µl de salina tamponada com fosfato (PBS)[†] para cada tira de papel absorvente que foi coletada e 0,01 ml de Tween[®] 20[‡]. As amostras permaneceram 30 minutos no agitador orbital de placa em temperatura ambiente. As amostras de saliva foram preparadas com tampão de diluição do kit específico (1:100).

4.12 Análise das proteínas salivares e do fluido gengival

A análise de expressão das proteínas na saliva e nas amostras de fluido gengival foi realizada por meio de imunoensaio *Multiplex Cytokine Profiling*, na plataforma Luminex. Esta tecnologia[§] realiza um processo exclusivo que cora microesferas de látex com dois fluoróforos. Utilizando proporções precisas de dois fluoróforos, podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas – cada uma

* StepOne Plus™ Real-Time PCR System, Life Applied Biosystems.

† Gibco, Life Technologies

‡ USB Corporation, Cleveland USA

¹⁷ Luminex™ xMAP, Luminex Corporation, Austin, TX, USA.

delas com uma assinatura baseada em “código de cores” e que podem ser identificadas pelo equipamento Luminex^{*}. Os kits[†] foram desenvolvidos com estas microesferas e se fundamentam no imunoensaio. Este imunoensaio foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante.

Anticorpos de captura específicos para cada analito (amostra) foram imobilizados nas microesferas por meio de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito ligou-se aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final foi feita por meio de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. O resultado final foi um ensaio “sanduíche” realizado por meio de microesferas. O equipamento Luminex foi movimentando estas esferas em fila única através de feixes de dois *lasers* diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detectou a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantificou o sinal de reporte em cada microesfera.

As amostras de saliva foram dosadas para VEGF, MMP-8, IL-10, RANKL, OPG e TGF- β_1 . As amostras de fluido gengival foram dosadas apenas para VEGF, MMP-8 e IL-10. A análise expressão de MMP-8[‡] foi realizada através do teste imunoenzimático ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.13 Análise Estatística

- Parâmetros clínicos:

Os dados foram registrados como média e desvio padrão em todos os parâmetros. Sítios específicos e indivíduos foram considerados para a análise estatística paramétrica ou não paramétrica após teste de normalidade (Teste Lilliefors). Com relação aos dados clínicos, para as comparações intragrupos, antes e 2 meses após a terapia periodontal, foi aplicado o teste Wilcoxon ou teste t, de acordo com a normalidade dos dados. Para comparações entre os grupos controle e DP nos tempos inicial e final, foi aplicado teste t ou teste Mann-Whitney, de acordo com a normalidade dos dados. O programa BioEstat[§] foi usado para a análise estatística.

¹⁸ Luminex 200[™], Luminex Corporation, Austin, TX, USA.

¹⁹ Milliplex[™], Millipore, Billerica, MA, USA.

[‡] ELISA Kit for MMP-8 – Human, 96 Wel plate/kit, USCN Life Sciences Inc.

[§] BioEstat 5.3

- Expressão de proteínas salivares:

Para as comparações intragrupos, antes e 2 meses após a terapia periodontal, foi aplicado o teste Wilcoxon ou teste t, de acordo com a normalidade dos dados. Para comparações entre os grupos controle e DP nos tempos inicial e final, foi aplicado teste t ou teste Mann-Whitney, de acordo com a normalidade dos dados.

- Expressão de proteínas do fluido gengival:

Para comparações intragrupos (indivíduo) nos tempos 0, 15 e 60 dias após a terapia periodontal, foi aplicado o teste Kruskal Wallis ou teste ANOVA (um critério), de acordo com a normalidade dos dados. Para comparações entre grupos nos tempos 0, 15 e 60 dias após a terapia periodontal, foi aplicado o teste Mann-Whitney.

Para as comparações intragrupos e entre grupos (sítios específicos), nos tempos 0, 15 e 60 dias após a terapia periodontal, foi aplicado o teste Kruskal Wallis ou teste ANOVA (um critério), de acordo com a normalidade dos dados.

Para as comparações de atividade de doença, foi aplicado o teste t ou teste Mann-Whitney, de acordo com a normalidade dos dados. Os parâmetros clínicos foram correlacionados à expressão de proteínas com a análise do coeficiente de correlação de Pearson.

- Expressão gênica:

A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak; Schmittgen, 2001). Dessa forma, os dados serão representados como diferença na expressão gênica (*fold regulation*) relativa a β -actina, que foi normalizada pela média geométrica dos controles.

A análise estatística foi realizada com os valores de ciclo *threshold* (Ct) e foi aplicado o teste ANOVA (um critério) ou teste Kruskal Wallis, de acordo com a normalidade dos dados.

Para todas as análises, foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 Resultados

5.1 Parâmetros clínicos

De 32 indivíduos que apresentaram todos os critérios de inclusão, somente 27 pacientes foram incluídos neste estudo. Cinco pacientes foram eliminados porque não terminaram o tratamento. Os dados demográficos da população deste estudo estão presentes na Tabela 2. Houve uma maior prevalência de mulheres e de brancos em todos os grupos, além da média de idade ser significativa ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Dados demográficos e parâmetros clínicos.

Parâmetros	Controle (n = 9)	DP (n = 18)	*p valor
Idade (anos)	33,2 ± 7,82	48,1 ± 7,82	p = 0,001***
Feminino	6 (66,7%)	13 (72,2%)	—
Masculino	3 (33,3%)	5 (27,8%)	—
Branco	9 (100%)	15 (83,3%)	—
Não branco	0 (0%)	3 (16,7%)	—
N° dentes	27,4 ± 4,2	23,7 ± 2,6	0,007
PS (mm)			
inicial	2,2 ± 0,1	3,1 ± 0,6	p < 0,0001**
2 meses	2,1 ± 0,1	2,4 ± 0,3	p = 0,0035**
p valor	NS*	< 0,0001**	—
Delta (Δ)	0,1 ± 0,2	0,7 ± 0,4	p < 0,0001**
NCIR (mm)			
inicial	8,3 ± 1,2	10,4 ± 1,2	p = 0,004***
2 meses	8,0 ± 1,0	9,5 ± 0,9	p = 0,0007***
p valor	NS**	0,0002*	—
Delta (Δ)	0,3 ± 0,3	0,9 ± 0,5	p = 0,0012**
IP (%)			
inicial	11,1 ± 6,3	68,9 ± 21,5	p < 0,0001**
2 meses	10,6 ± 6,0	31,8 ± 22,7	p = 0,0007***
p valor	NS**	< 0,0001**	—
Delta (Δ)	0,5 ± 4,8	37,1 ± 25	p < 0,0001**
ISG (%)			
inicial	7,0 ± 5,3	26,8 ± 11,8	p < 0,0001**
2 meses	5,0 ± 2,5	9,0 ± 7,9	NS***
p valor	NS**	< 0,0001**	—
Delta (Δ)	2,1 ± 4,5	17,8 ± 10,9	p = 0,0005***
SS (%)			
inicial	16,7 ± 10,3	49,3 ± 12,8	p < 0,0001***
2 meses	13,7 ± 7,7	27,2 ± 7,3	p = 0,0001**
p valor	NS*	< 0,0001**	—
Delta (Δ)	3,1 ± 7,2	22,1 ± 13,3	p = 0,0005**

NS – não significativa ($p < 0,05$).

* Teste de Wilcoxon para comparações de dados não normais.

** Teste t para comparações de dados normais pareados e não pareados.

*** Teste Mann Whitney para comparações de dados não normais e independentes.

Nas comparações intragrupos, no grupo DP houve diminuição significativa em todos os parâmetros clínicos após a terapia periodontal básica. Já no grupo

Controle, não houve diferença significativa após 2 meses. Nas comparações entre grupos, houve diferença significativa para todos os parâmetros antes e após terapia periodontal, exceto para o ISG após 2 meses. Em relação à diferença das médias inicial e final (delta), houve diferença significativa para todos os parâmetros entre o grupo Controle e o grupo DP.

As bolsas periodontais do grupo DP foram distribuídas de acordo com a categorização da profundidade de sondagem, como mostra na Tabela 3. Houve diferença significativa após a terapia periodontal básica, em todas as categorias.

Tabela 3 – Classificação das bolsas periodontais de acordo com a PS no grupo DP.

	Inicial	2 meses	*Valor de <i>p</i>
PS ≤ 3 mm (n. sítios)	100,5 ± 25,7	118,3 ± 17,1	< 0,0001
PS 4-6 mm (n. sítios)	34,9 ± 18,5	15,7 ± 8,3	< 0,0001
PS ≥ 7 mm (n. sítios)	6,2 ± 4,5	1,3 ± 1,6	0,0003

* Teste t para comparações de dados normais.

** Teste de Wilcoxon para comparações de dados não normais.

5.2 Sítios periodontais

Nos sítios em que foi feita a coleta de fluido gengival, foram observadas diferenças significantes entre os sítios com inflamação e sem inflamação para PS, NCIR e SS. Entre os sítios com inflamação e controle, foram observadas diferenças significantes para PS e IP. Não houve diferença significativa entre os sítios sem inflamação e controle (Tabela 4).

Tabela 4 – Diferenças entre os sítios com inflamação do grupo DP, sítios sem inflamação do grupo DP e sítios controle do grupo C.

	PS (mm)	NCIR (mm)	IP (%)	ISG (%)	SS (%)
Sítios com inflamação	1,93 ± 0,72	1,3 ± 0,82	46,3 ± 41,44	27,78 ± 38,35	38,89 ± 32,84
Sítios sem inflamação	0,6 ± 0,7 a	0,1 ± 1,0 a	22,2 ± 73,2	22,2 ± 54,8	- 22,2 ± 42,8
Sítios Controle	0,2 ± 0,4 a	0,4 ± 0,7	-11,1 ± 33,3 a	11,1 ± 33,3	0,0 a

Teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn para comparações entre os sítios DP, controle DP e controle C. a: significativamente menor do que os sítios com inflamação do grupo DP ($p < 0,05$).

No total, foram analisados 2436 sítios do grupo DP e estes foram classificados conforme atividade de doença periodontal em sítios ativos ou inativos (Figura 1). Houve maior ocorrência de sítios inativos ($p < 0,05$). A Figura 2 mostra a média de perda e ganho de inserção clínica nos sítios ativos e inativos, respectivamente.

Os sítios ativos e inativos foram relacionados de acordo com a presença de sangramento à sondagem (Figura 3). Não houve relação da atividade de doença com o sangramento à sondagem ($p = 0,73$).

Atividade de doença - grupo DP

Figura 1 – Distribuição de sítios ativos e inativos no grupo DP. Teste t, $p < 0,05$.

Figura 2 – Perda/ganho de inserção clínica nos sítios ativos e inativos do grupo DP. Teste t não pareado, $p < 0,05$.

Atividade de Doença X Sangramento à Sondagem

Figura 3 – Presença de sangramento à sondagem nos sítios ativos e inativos do grupo DP. SS: sangramento à sondagem. Teste Qui-quadrado, $p = 0,73$.

Os sítios ativos e inativos foram também categorizados de acordo com a profundidade de sondagem (Figura 4). Foi observada diferença significativa quando a distribuição das bolsas periodontais foi relacionada com a atividade de doença ($p = 0,03$).

Categorização da PS em sítios ativos e inativos

Figura 4 – Categorização das profundidades de sondagem dos sítios ativos e inativos do grupo DP.

PS: profundidade de sondagem

*Teste Qui-quadrado, $p = 0,03$.

5.3 Proteínas Salivares

A quantidade total de proteínas por amostra analisada está apresentada em picogramas (pg) e demonstrada na Tabela 5. Para o MMP-8, uma amostra do grupo DP e uma amostra do grupo Controle apresentaram valores acima da curva padrão. Para o VEGF, cinco amostras do grupo DP e quatro amostras do grupo Controle apresentaram valores acima da curva padrão. Nas análises de RANK-L, uma amostra do grupo DP apresentou concentração abaixo da curva padrão, sendo considerada zero.

Houve maior quantidade total de RANK-L no grupo DP (2,99 pg/amostra) quando comparado ao grupo Controle (1,2 pg/amostra) em 0 dias, sendo a diferença significativa ($p = 0,0313$). Após 60 dias da terapia periodontal, houve um aumento de RANK-L no grupo Controle, sendo a diferença significativa ($p = 0,0108$). A quantidade total de OPG foi maior no grupo DP antes da terapia periodontal, diminuindo após 60 dias ($p = 0,0002$). Para os demais marcadores, não houve diferença significativa nas comparações intra e entre grupos.

Tabela 5 – Quantidade total (pg/amostra) de MMP-8, VEGF, RANK-L, OPG, IL-10 e TGF- β_1 na saliva de pacientes do grupo DP e Controle antes e após a terapia periodontal.

	Grupo DP			Grupo Controle		
	0 Dias		valor p	60 Dias		valor p
MMP-8	563.6	741.3	0.2485	559.7	576.6	0.4696
VEGF	217.0	268.0	0.7564	238.1	228.1	0.9911
RANK-L	3.0 a	2.7	0.3958	1.2 a	2.7	0.0108*
OPG	289.9	116.4	0.0002**	131.4	83.8	0.1731
IL-10	2.2	2.0	0.9773	2.7	3.2	0.3096
TGF- β_1	22.2	18.5	0.2485	17.1	19.4	0.5881

*Teste t pareado; **Teste Wilcoxon. a: diferença significativa entre grupo DP e Controle em 0 dias. Teste t não pareado, $p = 0,0313$.

A razão relativa de RANK-L/OPG foi calculada e está apresentada na Figura 5. Após 60 dias da terapia periodontal, houve aumento da razão nos dois grupos, sendo ainda maior no grupo Controle.

Figura 5 – Razão relativa RANK-L/OPG nos grupo DP e Controle, antes e após a terapia periodontal básica.

5.4 Proteínas do Fluido gengival

A quantidade total de proteínas (VEGF, MMP-8, IL-10) por amostras de fluido gengival dos pacientes do grupo DP e grupo Controle está apresentada nas Figuras 6, 7 e 8. Para o cálculo, foi realizado o *pool* das amostras do grupo DP. As análises foram feitas nos tempos inicial (0 dias), 15 e 60 dias após a terapia periodontal. VEGF apresentou-se em maior quantidade no grupo DP (17,29 pg/amostra) comparado ao grupo Controle (8,17 pg/amostra), antes da terapia periodontal ($p = 0,007$). Nas demais comparações intragrupos e entre grupos, não houve diferença significativa (Figura 6).

Figura 6 – Quantidade total de VEGF (pg/amostra) nos grupo DP e Controle, em 0, 15 e 60 dias.

* Teste Mann-Whitney, $p = 0,007$.

Comparações intragrupos – Teste Kruskal-Wallis para dados não normais e Teste ANOVA (um critério) para dados normais.

Comparações entre grupos – Teste Mann-Whitney.

O grupo DP apresentou maior quantidade de IL-10 comparado ao grupo Controle, nos três tempos de análise, sendo a diferença significativa (Figura 7). Em relação à MMP-8, nas comparações intragrupos, o grupo DP apresentou maior quantidade em 60 dias após a terapia (256,3 pg/amostra) quando comparado aos tempos 0 dias (225,4 pg/amostra) e 15 dias (193,7 pg/amostra) ($p < 0,05$). Nas comparações entre grupos, o grupo Controle apresentou maior quantidade de MMP-8 em 15 dias (306,4 pg/amostra), quando comparado ao grupo DP no mesmo tempo (193,7 pg/amostra) ($p < 0,011$).

Figura 7 – Quantidade total de IL-10 (pg/amostra) nos grupo DP e Controle, em 0, 15 e 60 dias.

* Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Comparações intragrupos – Teste Kruskal-Wallis; comparações entre grupos – Teste Mann-Whitney.

Figura 8 – Quantidade total de MMP-8 (pg/amostra) nos grupo DP e Controle, em 0, 15 e 60 dias.

*Teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn para comparações intragrupos, nos tempos 0, 15 e 60 dias. $p < 0,05$.

** Teste Mann-Whitney para comparações entre grupos nos tempos 0, 15 e 60 dias. $p < 0,011$.

5.4.1 Proteínas do Fluido gengival de Sítios Periodontais

Para análise sítio-específica, foi feita coleta de fluido gengival de sítios com inflamação, sem inflamação e controle foram dosadas e estão apresentadas nas figuras 9, 10 e 11. Nestes sítios, também foram coletadas amostras de tecido gengival para análise de expressão gênica, que será mostrado mais adiante.

A quantidade total de VEGF foi maior nos sítios com inflamação (11,43 pg/amostra) quando comparado aos sítios sem inflamação (7,4 pg/amostra) após 15 dias da terapia periodontal ($p = 0,009$). Para as demais comparações, não houve diferença significativa (Figura 9). Já nas comparações intragrupos e entre grupos da quantidade de MMP-8, não houve diferença significativa nos tempos analisados (Figura 10).

A quantidade total de IL-10 apresentou-se maior nos sítios com inflamação (0,29 pg/amostra), quando comparados aos sítios sem inflamação (0,21 pg/amostra) e controle (0,21 pg/amostra) antes da terapia periodontal ($p < 0,05$). Nas demais comparações, não foram observadas diferenças significantes (Figura 11).

Figura 9 – Quantidade total de VEGF (pg/amostra) nos sítios com inflamação, sem inflamação e controle, em 0, 15 e 60 dias.

*Teste ANOVA (um critério), com pós-teste t para comparações intragrupos, nos tempos 0, 15 e 60 dias. $p = 0,009$.

Comparações intragrupos e entre grupos – Teste Kruskal-Wallis para dados não normais e Teste ANOVA (um critério) para dados normais.

Figura 10 – Quantidade total de MMP-8 (pg/amostra) nos sítios com inflamação, sem inflamação e controle, em 0, 15 e 60 dias.

Comparações intragrupos e entre grupos – Teste Kruskal-Wallis para dados não normais e Teste ANOVA (um critério) para dados normais.

Figura 11 – Quantidade total de IL-10 (pg/amostra) nos sítios com inflamação, sem inflamação e controle, em 0, 15 e 60 dias.

Comparações intragrupos e entre grupos – Teste Kruskal-Wallis para dados não normais e Teste ANOVA (um critério) para dados normais.

*Teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn; $p < 0,05$.

5.4.2 Atividade de doença X Quantidade total de proteínas do fluido gengival

A atividade de doença após a terapia periodontal básica, baseada no método de tolerância ⁵⁷, foi relacionada com a quantidade total dos marcadores no fluido gengival. As quantidades de MMP-8, VEGF e IL-10 estão dispostas nas figuras 12,

13 e 14. Não houve diferença significativa na quantidade total de MMP-8, VEGF e IL-10 entre os sítios ativos e inativos.

Figura 12 – Quantidade total de MMP-8 (pg/amostra) X Atividade de doença. Teste t não pareado, $p = 0,88$.

Figura 13 – Quantidade total de VEGF (pg/amostra) X Atividade de doença. Teste Mann-Whitney, $p = 0,98$.

Figura 14 – Quantidade total de IL-10 (pg/amostra) X Atividade de doença. Teste t não pareado, $p = 0,18$.

5.4.3 Correlações entre parâmetros clínicos e quantidade total de cada proteína

As correlações dos parâmetros clínicos iniciais e finais com a quantidade total de VEGF, MMP-8 e IL-10 foram avaliadas através do coeficiente de correlação de Pearson (Tabela 6).

Tabela 6 - Correlações entre parâmetros clínicos iniciais e finais e quantidade total de VEGF, MMP-8 e IL-10. Coeficiente de correlação de Pearson. * significativo.

	0 Dias			60 Dias		
	VEGF	MMP-8	IL-10	VEGF	MMP-8	IL-10
Com inflamação						
PS	r = -0,306 p = 0,21	r = 0,1189 p = 0,63	r = -0,450 p = 0,06	r = -0,087 p = 0,72	r = -0,238 p = 0,34	r = -0,1309 p = 0,60
NCIR	r = 0,1391 p = 0,58	r = -0,234 p = 0,34	r = -0,422 p = 0,08	r = 0,0872 p = 0,73	r = -0,357 p = 0,14	r = 0,4158 p = 0,08
Sem inflamação						
PS	r = -0,318 p = 0,19	r = 0,0235 p = 0,92	r = -0,132 p = 0,61	r = 0,521* p = 0,02	r = -0,328 p = 0,18	r = 0,5276* p = 0,02
NCIR	r = 0,1497 p = 0,55	r = 0,1949 p = 0,45	r = -0,58* p=0,01	r = -0,057 p = 0,82	r = -0,030 p = 0,90	r = -0,0068 p = 0,97
Controle						
PS	r = 0,0492 p = 0,9	r = -0,66* p=0,04	r = 0,2607 p = 0,49	r = 0,2716 p = 0,47	r = -0,05 p = 0,89	r = -0,3127 p = 0,41
NCIR	r = -0,177 p = 0,64	r = 0,3314 p = 0,38	r = 0,723* p=0,02	r = 0,3292 p = 0,38	r = -0,139 p = 0,72	r = -0,55 p = 0,12

Nos sítios sem inflamação, a quantidade total de IL-10 foi negativamente correlacionada com o nível clínico de inserção relativo inicial. Por outro lado, foi positivamente correlacionado com o nível clínico de inserção relativo inicial nos sítios controle. A quantidade total de MMP-8 foi negativamente correlacionada com a profundidade de sondagem inicial nos sítios controle. Após 60 dias da terapia periodontal básica, houve correlação positiva entre a profundidade de sondagem final e a quantidade total de VEGF e IL-10 nos sítios sem inflamação.

5.5 Análise da expressão gênica

Os resultados da expressão gênica foram dados pelo número de vezes (expressão em relação ao gene constitutivo) a partir de comparações entre os grupos do estudo (Tabela 8), apresentando expressão *up-regulated* ou *down-regulated*.

Tabela 7 – Comparações entre os grupos do estudo para a expressão gênica.

Sítios do grupo DP X Sítios do grupo Controle		
Sítios do grupo Controle	X	Sítios com inflamação
		Sítios sem inflamação
Sítios com inflamação	X	Sítios sem inflamação
Categorização da PS	X	Expressão gênica

5.5.1 Comparações entre sítios do grupo Controle e sítios do grupo DP

A expressão relativa dos genes RANK-L, OPG, MMP-8, VEGF, IL-10 e TGF- β_1 está disposta nas figuras a seguir (Figura 15 a 20). O gene OPG apresentou-se com maior expressão nos sítios controle quando comparado aos sítios sem inflamação ($p < 0,001$), assim como quando comparados aos sítios com inflamação ($p = 0,0047$) (Figura 15 A,B).

Nos sítios com inflamação, o gene IL-10 mostrou maior expressão, quando comparados aos sítios controle ($p = 0,026$). Não houve diferença significativa entre os sítios sem inflamação e controle (Figura 16 A,B). Os sítios controle apresentaram maior expressão do gene TGF- β_1 , quando comparados aos sítios sem inflamação ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os sítios com inflamação e controle (Figura 17 A,B).

A expressão dos genes RANK-L, VEGF e MMP-8 não demonstrou diferenças significantes entre os sítios com inflamação e controle e entre os sítios sem inflamação e controle (Figuras 18 a 20).

(A)

(B)

Figura 15 – Expressão relativa OPG/ACTB. A) Sítios sem inflamação comparados aos sítios controle ($p < 0,001$); B) Sítios com inflamação comparados aos sítios controle ($p < 0,0047$). Teste ANOVA (um critério).

(A)

(B)

Figura 16 – Expressão relativa IL-10/ACTB. A) Sítios sem inflamação comparados aos sítios controle (não significante); B) Sítios com inflamação comparados aos sítios controle ($p = 0,026$).

Teste ANOVA (um critério).

(A)

(B)

Figura 17 – Expressão relativa TGF- β 1/ACTB. A) Sítios sem inflamação comparados aos sítios controle ($p < 0,05$); B) Sítios com inflamação comparados aos sítios controle (não significativo). Teste Kruskal-Wallis.

(A)

(B)

Figura 18 – Expressão relativa de RANK-L/ACTB. a) Sítios com inflamação, comparados aos sítios controle (não significante); b) Sítios sem inflamação, comparados aos sítios controle (não significante). Teste ANOVA (um critério).

(A)

(B)

Figura 19 – Expressão relativa de VEGF/ACTB. a) Sítios com inflamação, comparados aos sítios controle (não significante); b) Sítios sem inflamação, comparados aos sítios controle (não significante).
Teste ANOVA (um critério); $p = 0,5$.

(A)

(B)

Figura 20 – Expressão relativa de MMP-8/ACTB. a) Sítios com inflamação, comparados aos sítios controle (não significante); b) Sítios sem inflamação, comparados aos sítios controle (não significante). Teste ANOVA (um critério); $p = 0,0509$.

Figura 21 - Razão RANKL/OPG nos sítios com inflamação, sem inflamação e controle.

5.5.2 Comparações entre sítios com inflamação e sítios sem inflamação

Os genes RANK-L, OPG, IL-10 e TGF- β_1 apresentaram maior expressão significativa nos sítios com inflamação, quando comparados aos sítios sem inflamação (Figuras 21 a 24). Essa expressão aumentada também foi observada nos genes MMP-8 e VEGF em relação aos mesmos sítios, porém, não foi significativa (Figuras 25 e 26).

Figura 22 – Expressão relativa RANK-L/ACTB nos sítios com inflamação comparados aos sítios sem inflamação.

Teste ANOVA (um critério), $p < 0,001$.

Figura 23 – Expressão relativa OPG/ACTB nos sítios com inflamação comparados aos sítios sem inflamação.

Teste ANOVA (um critério), $p = 0,0194$.

Figura 24 – Expressão relativa IL-10/ACTB nos sítios com inflamação comparados aos sítios sem inflamação.

Teste ANOVA (um critério), $p = 0,03$.

Figura 25 – Expressão relativa TGF- β 1/ACTB nos sítios com inflamação comparados aos sítios sem inflamação.

Teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

Figura 26 – Expressão relativa MMP-8/ACTB nos sítios com inflamação comparados aos sítios sem inflamação. Teste ANOVA (um critério), $p = 0,0509$

Figura 27 – Expressão relativa VEGF/ACTB nos sítios com inflamação comparados aos sítios sem inflamação. Teste ANOVA (um critério), $p = 0,52$.

A razão RANKL/OPG também foi calculada. Os sítios com inflamação mostraram maior tendência à apresentar elevada RANKL/OPG comparado aos sítios sem inflamação e controle (Figura 28).

Figura 28 – Razão RANKL/OPG nos sítios com inflamação, sem inflamação e controle.

5.5.3 Comparações entre categorização da profundidade de sondagem e expressão gênica

As profundidades de sondagem iniciais foram categorizadas em: PS < 3 mm, PS 5-6 mm e PS > 7mm; e comparadas com a expressão relativa de cada gene. Houve maior expressão do gene RANK-L nas bolsas periodontais com PS 5-6 mm, quando comparadas aos sítios com PS < 3 mm ($p < 0,05$) (Figura 33). Em relação à expressão do gene TGF- β_1 , apresentou-se com maior expressão nas bolsas periodontais com PS > 7 mm do que nas nos sítios com PS < 3 mm ($p < 0,05$) (Figura 34).

Figura 29 – Categorização da profundidade de sondagem inicial X Expressão relativa RANK-L/ACTB; diferença significativa entre PS < 3mm e PS 5-6mm ($p < 0,05$). Teste ANOVA (um critério).

Figura 30 – Categorização da profundidade de sondagem inicial X Expressão relativa TGF-β₁/ACTB; diferença significativa entre PS < 3mm e PS > 7mm ($p < 0,05$). Teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

Para os demais genes (OPG, VEGF, MMP-8 e IL-10), não houve diferença significativa na expressão relativa das diferentes profundidades de sondagem (Figuras 35 a 38).

Figura 31 – Categorização da profundidade de sondagem inicial X Expressão relativa OPG/ACTB; Teste ANOVA (um critério); $p = 0,26$.

Figura 32 – Categorização da profundidade de sondagem inicial X Expressão relativa VEGF/ACTB; Teste Kruskal-Wallis; $p = 0,95$.

Figura 33 – Categorização da profundidade de sondagem inicial X Expressão relativa MMP-8/ACTB; Teste ANOVA (um critério); $p = 0,68$.

Figura 34 – Categorização da profundidade de sondagem inicial X Expressão relativa IL-10/ACTB; Teste ANOVA (um critério); $p = 0,29$.

5.5.4 Correlações entre parâmetros clínicos e expressão relativa

As correlações dos parâmetros clínicos iniciais com a expressão relativa de VEGF, MMP-8, IL-10, RANK-L, OPG e TGF- β_1 foram avaliadas através do coeficiente de correlação de Pearson. Houve correlação negativa entre a profundidade de sondagem e a expressão relativa de TGF- β_1 nos sítios com inflamação. Para os demais, não houve correlação significativa (Tabela 8).

Tabela 8 - Correlações entre parâmetros clínicos iniciais e expressão relativa de VEGF, MMP-8, IL-10, RANK-L, OPG e TGF- β_1 . Coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado. * significativo.

	VEGF	MMP-8	IL-10	RANK-L	OPG	TGF- β_1
	Com inflamação					
PS	r = -0,036 p = 0,90	r = -0,073 p = 0,81	r = 0,0099 p = 0,97	r = 0,0488 p = 0,86	r = -0,174 p = 0,55	r = -0,70* p = 0,004
NCIR	r = -0,153 p = 0,59	r = 0,0833 p = 0,78	r = 0,3625 p = 0,20	r = 0,122 p = 0,67	r = 0,4497 p = 0,10	r = -0,118 p = 0,68
	Sem inflamação					
PS	r = -0,018 p = 0,95	r = 0,2119 p = 0,48	r = -0,128 p = 0,66	r = -0,329 p = 0,25	r = -0,146 p = 0,61	r = -0,037 p = 0,89
NCIR	r = 0,2239 p = 0,44	r = 0,1404 p = 0,64	r = 0,1926 p = 0,50	r = 0,0826 p = 0,77	r = 0,3168 p = 0,26	r = 0,0434 p = 0,88

6 Discussão

A periodontite crônica é uma doença infecciosa caracterizada pela inflamação dos tecidos de suporte dos dentes, perda de inserção e perda óssea ¹. O desequilíbrio entre o biofilme bacteriano e a suscetibilidade do hospedeiro, causa a liberação de mediadores inflamatórios responsáveis pela destruição tecidual ^{5, 15}. O diagnóstico convencional da periodontite é realizado por meio da avaliação dos parâmetros clínicos e radiográficos ². Entretanto, novas modalidades diagnósticas para identificação do início e progressão da periodontite estão sendo estudadas, o que possibilitaria a previsão da progressão da doença, assim como avaliação da resposta ao tratamento periodontal ^{3, 4}.

No presente estudo, foi realizada a análise de parâmetros clínicos e de biomarcadores na saliva, fluido gengival e tecido gengival de pacientes com periodontite crônica e pacientes periodontalmente saudáveis. As análises dos biomarcadores foram realizadas previamente a terapia periodontal, e após 15 e 60 dias. Clinicamente, foram observadas diferenças significantes em relação a todos os parâmetros clínicos avaliados entre os grupos DP e Controle previamente ao tratamento.

Após a terapia periodontal básica, houve melhora significativa dos parâmetros clínicos dos pacientes do grupo DP, apresentando redução da profundidade de sondagem ($0,7 \text{ mm} \pm 0,4$), ganho de nível clínico de inserção relativo ($0,9 \text{ mm} \pm 0,5$), redução de sangramento à sondagem e índice de placa ($37,1 \% \pm 25$ e $27,2 \% \pm 7,3$, respectivamente). Nossos resultados estão de acordo com dados da literatura que mostram melhora dos parâmetros clínicos após raspagem e alisamento radicular após uma única sessão ⁵⁸⁻⁶⁰. Entretanto, alguns estudos que realizaram raspagem e alisamento radicular em várias sessões ^{61, 62}, obtiveram maior redução de profundidade de sondagem, provavelmente pelo maior tempo para finalização do tratamento e instrução de higiene oral.

A atividade da doença periodontal é geralmente aceita como perda tecidual e óssea ^{57, 63}. Episódios de perda de inserção podem estar associados com variações de células inflamatórias, apresentando maior presença de monócitos/macrófagos em sítios ativos comparados a inativos ⁶⁴. A atividade da doença periodontal foi associada a alguns marcadores de inflamação ⁶⁵⁻⁶⁷. Em nosso estudo, 17% do total de sítios foram classificados em atividade de doença, de acordo com o método de tolerância ⁵⁷. Porém, não observamos diferenças significantes na quantidade total de MMP-8, VEGF e IL-10 nos sítios ativos comparados aos sítios inativos. Além disso,

não observamos relação entre sangramento à sondagem e distribuição dos sítios ativos e inativos. Apesar de alguns autores terem observado relação de sangramento à sondagem com atividade de doença⁶⁸, outros autores apresentaram resultados semelhantes aos do presente estudo⁶⁹.

Através da análise de biomarcadores no fluido gengival, observamos maior quantidade de IL-10 no fluido gengival de sítios com inflamação (0,29 pg/amostra) comparados aos sítios controle (0,07 pg/amostra), antes do tratamento, contrariando os resultados de Goutoudi *et al* (2004)⁷⁰. Na análise da expressão gênica, observamos maior expressão de IL-10 mRNA nos sítios com inflamação comparado aos sítios sem inflamação e controle, corroborando com os resultados de alguns estudos anteriores^{23, 71, 72}. Nossos resultados mostraram maior expressão de MMP-8 mRNA em sítios controle, apesar de não significativo.

Isso pode ser explicado pela ação de IL-10 que reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa, IL-1 β e MMPs. Por apresentar função protetora contra destruição óssea, IL-10 atua inibindo MMPs⁷¹ através do aumento da expressão de Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs), os quais são capazes de inibir boa parte dos membros da família das MMPs⁷³. Sendo assim, a expressão aumentada de IL-10 nos sítios com inflamação, pode controlar o potencial destrutivo da resposta Th1 e, por consequência, reduzir a presença de formas severas da periodontite²³, podendo também estar relacionado à menor expressão de MMP-8 em sítios com inflamação.

Muitos estudos vêm demonstrando a associação de MMP-8 com o início e progressão da periodontite, além de refletir sua severidade^{34, 74}. Além disso, autores observaram que MMP-8 representava 80% do total de collagenases encontradas no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica⁷⁵. A ativação do MMP-8 pode ocorrer em uma cascata de eventos, em que espécies de oxigênio reativo e outras MMPs apresentam importantes funções nessa ativação⁷⁴.

A detecção das formas latente e ativa de MMP-8 em fluidos orais pode não necessariamente estar correlacionada com a progressão da doença, pois a forma ativa está associada à periodontite, enquanto que a forma latente está associada à gengivite^{76, 77}. A técnica do ensaio imunofluorimétrico foi utilizada para detectar a forma ativa de MMP-8 em alguns estudos^{61, 76, 78}. Os anticorpos utilizados no ensaio imunofluorimétrico identificam isotipos de MMP-8, como tipos neutrofílicos e fibroblastos, especialmente na forma ativa⁷⁶.

Nossos dados mostraram quantidade ligeiramente aumentada de MMP-8 na saliva dos pacientes do grupo DP e Controle após 60 dias, apesar de não significativa. Além disso, observamos maior quantidade MMP-8 no fluido gengival de sítios controle comparados aos sítios com inflamação. Possivelmente, isso pode estar relacionado à técnica utilizada para análise de MMP-8 nas amostras de saliva e fluido gengival do presente estudo. O ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizado é um método baseado na detecção de todas as formas de MMP-8, latente ou ativa ⁷⁹.

Dessa forma, sugerimos que, como provavelmente não houve diferenciação dos isotipos de MMP-8, essa quantidade aumentada após o tratamento, pode estar associada à presença tanto de formas ativas, como de formas latentes, dificultando a associação do marcador ao diagnóstico da doença periodontal. Porém, inúmeros estudos demonstraram maior quantidade e concentração de MMP-8 no fluido gengival e saliva de pacientes com periodontite crônica comparado aos pacientes saudáveis, mesmo através do método ELISA ^{58, 62, 78, 80, 81}.

Associada a destruição tecidual, a perda óssea alveolar também é característica da periodontite crônica. O mecanismo de regulação da atividade dos osteoclastos é realizado por membros da família do TNF de receptores RANK-OPG-RANKL ³⁰. Poucos estudos avaliaram a quantidade e concentração de RANK-L e OPG em saliva de pacientes com periodontite crônica comparado a pacientes saudáveis. Concluíram que, em pacientes com periodontite crônica comparado a pacientes periodontalmente saudáveis, RANK-L apresentava-se em maior quantidade e/ou concentração ^{3, 82} OPG apresentava-se em menor quantidade e/ou concentração ⁸² e também em menor expressão em tecido gengival ^{83, 84}.

Nossos dados demonstraram que RANK-L apresentou-se em maior quantidade significativa na saliva dos pacientes do grupo DP em 0 dias (2,99 pg/amostra), reduzindo após a terapia (2,67 pg/amostra), porém sem significância estatística. No grupo Controle, esse mesmo marcador apresentou aumento significativo após 60 dias. Previamente ao tratamento, OPG apresentou-se em maior quantidade na saliva de pacientes do grupo DP (289,9 pg/amostra), reduzindo significativamente após 60 dias (116,4 pg/amostra). Dessa forma, a razão RANK-L/OPG na saliva foi aumentada após o tratamento periodontal, nos dois grupos. Devido à escassez de estudo que avaliem o sistema RANK-L/OPG ⁸⁵, resultados conflitantes foram encontrados. Tobón-Arroyave *et al* (2012) observaram RANK-L/OPG significativamente maior em pacientes com periodontite crônica, discordando

de nossos resultados ⁸⁶. Porém, Frodge *et al* (2008) ³ não detectaram RANKL na saliva de pacientes com periodontite crônica e controle, confirmado a necessidade de estudos sobre o marcador na saliva.

Na análise sítio-específica, os sítios com inflamação apresentaram maior expressão significativa de RANK-L mRNA comparado aos sítios sem inflamação. Além disso, apresentou maior expressão de OPG mRNA nos sítios com inflamação comparado aos sítios sem inflamação. Por consequência, a razão RANKL/OPG mRNA apresentou maior expressão nos sítios com inflamação. Garlet *et al.* (2004) observaram maior expressão de RANK-L mRNA pacientes com periodontite crônica comparado ao grupo controle, assim como maior expressão de IL-10 mRNA. Apesar de não significativo, a expressão de OPG foi maior no grupo com periodontite ⁷¹. De acordo com o autor, o aumento da expressão de OPG pode estar relacionado ao controle da doença e perda óssea direcionada pelo RANK-L, atenuando a progressão e severidade da doença. A expressão de RANK-L e MMPs pode resultar na destruição tecidual e progressão da doença, enquanto que o aumento da expressão de TIMPs e OPG, possivelmente induzido pela IL-10, pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo controle da destruição tecidual ⁷¹.

Associado a esses resultados, observamos maior expressão significativa de TGF- β_1 mRNA em sítios com inflamação comparados aos sítios sem inflamação. Dutzan *et al* (2012) ⁸⁷ observaram maior expressão de TGF- β_1 em sítios saudáveis comparados aos sítios com periodontite, o que em nosso estudo não foi significativo. Ao contrário, nossos resultados observaram maior expressão de TGF- β_1 em sítios com inflamação e em sítios controle comparados aos sítios sem inflamação, provavelmente indicando a característica antiinflamatória do TGF- β_1 em sítios com inflamação, promovendo modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias e estimulando a produção do receptor antagonista de IL-1 que regula atividades antiinflamatórias e imunossupressoras ⁴³.

Em relação ao VEGF, apenas observamos diferenças significativas entre sítios com inflamação (11,43 pg/amostra) e sítios sem inflamação (7,38 pg/amostra) após 15 dias do tratamento. Apesar de não significativo, a quantidade total de VEGF foi maior nos sítios com inflamação nos 3 tempos. Isso pode sugerir que, como as biópsias foram coletadas de sítios que receberam tratamento periodontal não cirúrgico, não está claro se a quantidade de VEGF está relacionada ao processo patológico da doença ou ao processo de cicatrização após o tratamento. Além disso,

a presença de VEGF no fluido gengival de pacientes saudáveis pode refletir uma inflamação em níveis sub-clínicos, cicatrização após o desafio microbiano ou angiogênese fisiológica dos tecidos periodontais ⁴⁶.

Após análise de correlação, foi observada correlação positiva entre quantidade de IL-10 no fluido gengival e NCIR nos sítios controle e correlação negativa entre a quantidade da mesma citocina e NCIR nos sítios sem inflamação, previamente a terapia periodontal. 60 dias após a terapia, observamos correlação positiva entre a quantidade de IL-10 no fluido gengival e PS de sítios sem inflamação. A quantidade de VEGF e MMP-8 não foi correlacionada a nenhum parâmetro clínico, não estando de acordo com alguns estudos que mostraram correlação entre MMP-8 e parâmetros clínicos periodontais ^{58, 61}. Na correlação da expressão gênica, o TGF- β_1 apresentou correlação negativa com PS nos sítios com inflamação antes do tratamento. Os demais genes não mostraram correlação com os parâmetros clínicos, estando de acordo com Garlet *et al* (2004) ⁷¹.

Os dados obtidos nesse estudo indicaram melhoras significativas nos parâmetros clínicos após 60 dias da terapia periodontal. Porém, os níveis de marcadores de inflamação, como VEGF, MMP-8 e IL-10 no fluido gengival de sítios com inflamação e sem inflamação permaneceram sem alterações significativas. Isso pode sugerir que os resultados da terapia não cirúrgica em curto prazo podem causar melhora dos parâmetros clínicos, mas o processo inflamatório ou cicatricial após a terapia ainda podem estar ocorrendo e mascarando variações importantes.

7 Conclusão

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo pode-se concluir que:

- A atividade da doença em sítios periodontais após a terapia básica é um evento de baixa ocorrência. Apenas uma pequena fração dos sítios apresenta perda de inserção progressiva;
- A maior expressão de RANKL parece ser um indicador, tanto na saliva como em biópsias, de sítios com inflamação;
- Apesar da maior expressão de RANKL na saliva de pacientes com periodontite crônica e em sítios com inflamação indicar a possibilidade de destruição óssea, a maior expressão de OPG, IL-10 e TGF- β_1 pode ser responsável pelo controle da destruição tecidual;
- O tempo de avaliação (15 e 60 dias) dos marcadores moleculares no fluido gengival (VEGF, MMP-8 e IL-10) pode ter sido curto para mostrar alterações comparáveis aos parâmetros clínicos após a terapia periodontal;
- A atividade de doença não foi relacionada à presença de sangramento à sondagem e à quantidade de IL-10, VEGF e MMP-8 no fluido gengival após 2 meses;

8 Referências Bibliográficas

1. Flemmig TF. Periodontitis. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1999;4:32-38.
2. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2004;34:9-21.
3. Frodge BD, Ebersole JL, Kryscio RJ, Thomas MV, Miller CS. Bone remodeling biomarkers of periodontal disease in saliva. *J Periodontol* 2008;79:1913-1919.
4. de Souza SL, Taba M, Jr. Cross-sectional evaluation of clinical parameters to select high prevalence populations for periodontal disease: the site comparative severity methodology. *Braz Dent J* 2004;15:46-53.
5. Taba M, Jr., Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dental clinics of North America* 2005;49:551-571, vi.
6. Sexton WM, Lin Y, Kryscio RJ, Dawson DR, 3rd, Ebersole JL, Miller CS. Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. *J Clin Periodontol* 2011;38:434-441.
7. Kumar MS, Vamsi G, Sripriya R, Sehgal PK. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *J Periodontol* 2006;77:1803-1808.
8. Guneri P, Unlu F, Yesilbek B, et al. Vascular endothelial growth factor in gingival tissues and crevicular fluids of diabetic and healthy periodontal patients. *J Periodontol* 2004;75:91-97.
9. César-Neto JB, Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Sallum EA, Nociti FH. Smoking modulates interleukin-6:interleukin-10 and RANKL:osteoprotegerin ratios in the periodontal tissues. *J Periodontal Res* 2007;42:184-191.
10. Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, et al. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol* 2006;77:1863-1870.
11. Miller CS, King CP, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc* 2006;137:322-329.
12. Burt BA. Periodontitis and aging: reviewing recent evidence. *J Am Dent Assoc* 1994;125:273-279.
13. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1999;4:1-6.

14. Reddy MS, Geurs NC, Jeffcoat RL, Proskin H, Jeffcoat MK. Periodontal disease progression. *J Periodontol* 2000;71:1583-1590.
15. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005;38:135-187.
16. Aurer A, Stavljenić-Rukavina A, Aurer-Kozelj J. [Markers of periodontal destruction in saliva of periodontitis patients]. *Acta Med Croatica* 2005;59:117-122.
17. Loos BG. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* 2005;76:2106-2115.
18. Ichinose Y, Hara N, Ohta M, et al. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor and lipopolysaccharide maintain the phenotype of and superoxide anion generation by neutrophils. *Infect Immun* 1990;58:1647-1652.
19. Berker E, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Effect of neutrophil apoptosis on monocytic cytokine response to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Periodontol* 2005;76:964-971.
20. Graves DT, Jiang Y, Genco C. Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. *Curr Opin Infect Dis* 2000;13:227-232.
21. Arakawa S, Nakajima T, Ishikura H, Ichinose S, Ishikawa I, Tsuchida N. Novel apoptosis-inducing activity in *Bacteroides forsythus*: a comparative study with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 2000;68:4611-4615.
22. Jankovic D, Liu Z, Gause WC. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends in immunology* 2001;22:450-457.
23. Garlet GP, Martins W, Jr., Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res* 2003;38:210-217.
24. Passoja A, Puijola I, Knuuttila M, et al. Serum levels of interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010;37:881-887.
25. Butler LD, Layman NK, Cain RL, et al. Interleukin 1-induced pathophysiology: induction of cytokines, development of histopathologic changes, and immunopharmacologic intervention. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;53:400-421.
26. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res* 1993;28:500-510.

27. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *Journal of molecular medicine* 2005;83:170-179.
28. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature reviews Genetics* 2003;4:638-649.
29. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol 2000* 2010;52:163-206.
30. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289:1504-1508.
31. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-176.
32. Ryan ME, Ramamurthy S, Golub LM. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. *Curr Opin Periodontol* 1996;3:85-96.
33. Buduneli E, Vardar-Sengul S, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, Sorsa T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 gamma2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. *J Periodontol* 2007;78:127-134.
34. Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res* 1988;23:386-393.
35. Ingman T, Sorsa T, Konttinen YT, et al. Salivary collagenase, elastase- and trypsin-like proteases as biochemical markers of periodontal tissue destruction in adult and localized juvenile periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8:298-305.
36. Tonetti MS, Freiburghaus K, Lang NP, Bickel M. Detection of interleukin-8 and matrix metalloproteinases transcripts in healthy and diseased gingival biopsies by RNA/PCR. *J Periodontal Res* 1993;28:511-513.
37. Aiba T, Akeno N, Kawane T, Okamoto H, Horiuchi N. Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. *Eur J Oral Sci* 1996;104:562-569.
38. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:12-20.
39. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000* 1997;14:112-143.

40. Sporn MB, Roberts AB. The transforming growth factor-betas: past, present, and future. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1990;593:1-6.
41. Wright HJ, Chapple IL, Matthews JB. TGF-beta isoforms and TGF-beta receptors in drug-induced and hereditary gingival overgrowth. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 2001;30:281-289.
42. Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: an overview. *Kidney international Supplement* 1995;49:S19-23.
43. Turner M, Chantry D, Katsikis P, Berger A, Brennan FM, Feldmann M. Induction of the interleukin 1 receptor antagonist protein by transforming growth factor-beta. *European journal of immunology* 1991;21:1635-1639.
44. Kiritsy CP, Lynch AB, Lynch SE. Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 1993;4:729-760.
45. Wright HJ, Chapple IL, Matthews JB. Levels of TGFbeta1 in gingival crevicular fluid during a 21-day experimental model of gingivitis. *Oral diseases* 2003;9:88-94.
46. Booth V, Young S, Cruchley A, Taichman NS, Paleolog E. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *J Periodontal Res* 1998;33:491-499.
47. Johnson RB, Serio FG, Dai X. Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal diseases. *J Periodontol* 1999;70:848-852.
48. Suthin K, Matsushita K, Machigashira M, et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 2003;38:90-96.
49. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American journal of pathology* 1995;146:1029-1039.
50. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews* 1997;18:4-25.
51. Chapple CC, Kumar RK, Hunter N. Vascular remodelling in chronic inflammatory periodontal disease. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 2000;29:500-506.
52. Unlu F, Guneri PG, Hekimgil M, Yesilbek B, Boyacioglu H. Expression of vascular endothelial growth factor in human periodontal tissues: comparison of healthy and diabetic patients. *J Periodontol* 2003;74:181-187.

53. Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2004;343:1-16.
54. O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol* 1972;43:38.
55. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993;694:72-77.
56. Quirynen M, Mongardini C, Pauwels M, Bollen CM, Van Eldere J, van Steenberghe D. One stage full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. II. Long-term impact on microbial load. *J Periodontol* 1999;70:646-656.
57. Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. *J Clin Periodontol* 1983;10:257-265.
58. Konopka L, Pietrzak A, Brzezinska-Blaszczyk E. Effect of scaling and root planing on interleukin-1 β , interleukin-8 and MMP-8 levels in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Periodontol Res* 2012;47:681-688.
59. Scharf S, Wohlfeil M, Siegelin Y, Schacher B, Dannewitz B, Eickholz P. Clinical results after nonsurgical therapy in aggressive and chronic periodontitis. *Clinical oral investigations* 2014;18:453-460.
60. Preus HR, Gunleiksrud TM, Sandvik L, Gjermo P, Baelum V. A randomized, double-masked clinical trial comparing four periodontitis treatment strategies: 1-year clinical results. *J Periodontol* 2013;84:1075-1086.
61. Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mantyla P, Ronka H, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2000;27:366-369.
62. Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2010;37:180-190.
63. Jeffcoat MK, Reddy MS. Progression of probing attachment loss in adult periodontitis. *J Periodontol* 1991;62:185-189.
64. Zappa U, Simona C, Schappi P, Graf H, Espeland M. Episodic probing attachment loss in humans: histologic associations. *J Periodontol* 1990;61:420-426.

65. Vernal R, Chaparro A, Graumann R, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2004;75:1586-1591.
66. Reinhardt RA, Stoner JA, Golub LM, et al. Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis. *J Periodontol* 2010;81:251-259.
67. Hernandez M, Gamonal J, Tervahartiala T, et al. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. *J Periodontol* 2010;81:1644-1652.
68. Haffajee AD, Socransky SS, Lindhe J, Kent RL, Okamoto H, Yoneyama T. Clinical risk indicators for periodontal attachment loss. *J Clin Periodontol* 1991;18:117-125.
69. Timmerman MF, Van der Weijden GA, Abbas F, et al. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Longitudinal clinical data and prospective clinical and microbiological risk assessment. *J Clin Periodontol* 2000;27:932-942.
70. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *Journal of dentistry* 2004;32:511-520.
71. Garlet GP, Martins W, Jr., Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004;31:671-679.
72. Napimoga MH, Nunes LH, Maciel AA, et al. Possible involvement of IL-21 and IL-10 on salivary IgA levels in chronic periodontitis subjects. *Scandinavian journal of immunology* 2011;74:596-602.
73. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of cell science* 2002;115:3719-3727.
74. Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Annals of medicine* 2006;38:306-321.
75. Golub LM, Lee HM, Stoner JA, et al. Subantimicrobial-dose doxycycline modulates gingival crevicular fluid biomarkers of periodontitis in postmenopausal osteopenic women. *J Periodontol* 2008;79:1409-1418.

76. Sorsa T, Hernandez M, Leppilahti J, Munjal S, Netuschil L, Mantyla P. Detection of gingival crevicular fluid MMP-8 levels with different laboratory and chair-side methods. *Oral diseases* 2010;16:39-45.
77. Teles R, Sakellari D, Teles F, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol* 2010;81:89-98.
78. Gursoy UK, Kononen E, Pradhan-Palikhe P, et al. Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as markers of advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010;37:487-493.
79. Knauper V, Kramer S, Reinke H, Tschesche H. Partial amino-acid sequence of human PMN leukocyte procollagenase. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 1990;371:733.
80. Costa PP, Trevisan GL, Macedo GO, et al. Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *J Periodontol* 2010;81:384-391.
81. Romero AM, Mastromatteo-Alberga P, Escalona L, Correnti M. [MMP-3 and MMP-8 levels in patients with chronic periodontitis before and after nonsurgical periodontal therapy]. *Investigacion clinica* 2013;54:138-148.
82. Kinney JS, Morelli T, Braun T, et al. Saliva/pathogen biomarker signatures and periodontal disease progression. *Journal of dental research* 2011;90:752-758.
83. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res* 2003;38:380-387.
84. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *International journal of molecular medicine* 2003;11:17-21.
85. Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol* 2012;39:239-248.
86. Tobon-Arroyave SI, Isaza-Guzman DM, Restrepo-Cadavid EM, Zapata-Molina SM, Martinez-Pabon MC. Association of salivary levels of the bone remodelling regulators sRANKL and OPG with periodontal clinical status. *J Clin Periodontol* 2012;39:1132-1140.
87. Dutzan N, Vernal R, Vaque JP, et al. Interleukin-21 expression and its association with proinflammatory cytokines in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2012;83:948-954.

Artigo

Identification of progressive periodontal sites and molecular markers of disease activity

Running Title: Identification of progressive periodontal sites

Cristine D'Almeida Borges¹, Viviane Casagrande Mariguela¹, Milla Sprone Tavares Ricoldi¹, Michel Reis Messoria, Márcio Fernando de Moraes Grisi¹, Sérgio Luís Scombatti de Souza¹, Arthur Belém Novaes Júnior¹, Mário Taba Júnior¹

¹ Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Phone number: 55 16 36024135. Fax number: 55 16 3602 4788

Corresponding author:

Mario Taba, Jr. Department of Oral Surgery and Periodontology, University of São Paulo - Ribeirão Preto School of Dentistry, Avenida do Café - s/n, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: mtaba@usp.br

Key words: attachment loss, periodontal, biomarkers.

Conflict of Interest and Source of Funding: The authors declare no potential conflict of interest. This study was financially supported by FAPESP.

Abstract

Background: This study aimed to monitor periodontal disease activity and investigate clinical and molecular features of active sites through gingival crevicular fluid and gingival tissue samples.

Material and Methods: Fifty-seven subjects were enrolled for this study, 18 with chronic periodontitis (PD group) and 9 subjects that were periodontal and systemically healthy (control group). The patients underwent clinical examination and collection of gingival crevicular fluid at baseline, 15 days and 2 months after therapy; and collection of gingival tissue samples at baseline. Samples of gingival crevicular fluid were collected for assessment of the levels of MMP-8, VEGF and IL-10 using the multiplex cytokine profiling assay, except for MMP-8 (ELISA assay). Inflamed and non-inflamed lesion in each patient underwent biopsy for the Real Time PCR gene expression analysis for MMP-8, VEGF, IL-10, RANKL, OPG and TGF- β_1 .

Results: At baseline, higher expression of mRNA for RANK-L, OPG, IL-10 e TGF- β_1 were found in inflamed sites ($p < 0.05$) and higher amount of IL-10 (0,29 pg/sample) compared to non-inflamed (0,21 pg/sample) and control sites (0.21 pg/sample) ($p < 0.05$). 15 days after therapy, amount of VEGF were higher in inflamed sites (11.43 pg/sample), compared to non-inflamed sites (7.38 pg/sample) ($p=0.009$).

Conclusion: We concluded that disease activity seems to be an event of relative low probability of occurrence, however, a small percentage of sites keeps showing progressive attachment loss even after basic periodontal therapy. The specific biomarkers used in this study may be helpful to detect inflammation but not to discriminate progressive active sites.

INTRODUCTION

Periodontal disease is a chronic microbial infection characterized by inflammation of supportive tissues and alveolar bone loss. Particularly in chronic periodontitis, the presence of local irritants is compatible with severity of disease ¹. Although bacteria are essential in the onset and maintenance of periodontitis, susceptibility and disease progression are determined by a complex interaction driven by the immune-inflammatory host response ^{2,3}.

Locally, bacterial lipopolysaccharides induce inflammatory cells to release proinflammatory mediators that seem to act in the destruction of the periodontal tissues ^{3,4}. The presence of inflammatory cells and lymphocytes in the infiltrate, the chemotactic factors involved in the recruitment of these cells and cytokines are involved in the pathogenesis and progression of the periodontal disease ⁵.

The activation of local immune response by T helper cells would determine the stability or progression of periodontal disease. This immune response may exhibit a Th1 pattern consisting of proinflammatory cellular response, or a Th2 pattern, with anti-inflammatory characteristics ⁶. The action of chemokines and cytokines involved in the pathogenesis of periodontal disease, stimulates migration of natural-killer cells, macrophages lymphocytes, leukocytes polymorphonuclear to gingival tissues. These cells are enrolled in immune and inflammatory response, pathogen elimination and production of more cytokines.

The selective recruitment of different cells stimulates cytokines production and may determine the progression of disease ⁷. These cytokines associated to host defense has been identified in saliva ^{3,8}, blood ⁹, gingival crevicular fluid⁷ and gingival tissues^{10, 11}. Elevated levels of these molecules may be related to periodontal disease condition, allowing identification and controlling patients with periodontal disease ¹².

However, considering the complexity of periodontal disease and the involvement of innumerable cytokines and growth factors, it's unlikely the use of a unique biomarker for periodontal disease diagnostic. Studies that aim to analyze various biomarkers during disease progression seems to be promising in periodontal diagnostic ¹³. Therefore, in this study, we aimed to monitor periodontal disease activity and investigate clinical and molecular features of active sites through saliva, gingival crevicular fluid and gingival tissue samples.

MATERIAL AND METHODS

Study subjects:

A total of 27 patients were selected; amongst which 18 presented chronic periodontitis (group CP) and 9 were healthy (control group). The patients were chosen from the dental clinics of the Ribeirão Preto School of Dentistry and were invited to take part in the study. All enrolled subjects gave written consent on a form approved by the Ethics Committee Protocol of the Ribeirão Preto School of Dentistry - USP (approval number # 02841912.0.0000.5419). The subjects underwent anamnesis, clinical and radiographic examination. According to their periodontal condition and general health status, they were invited to participate in the study if when the entry criteria were fulfilled.

As inclusion criteria, the patients should have at least 14 natural teeth, 10 of which should be posterior teeth. The patients presenting chronic periodontitis should be at least 35 years old and exhibit 5 teeth with a probing depth (PD) of ≥ 5 mm and clinical attachment loss of ≥ 3 mm¹⁴. Patients from the control group should present PD ≥ 3 mm in all teeth and plaque index and bleeding on probing values should be $\leq 20\%$, with some aesthetic surgeries needed.

Exclusion criteria included history of smoking, pregnancy, presence of chronic inflammatory conditions or immunologic compromise, such as arthritis and gastrointestinal disorder or continuous use of anti-inflammatory medication, antibiotics, immunosuppressive or anticoagulants. Also, could not have received periodontal treatment in the six months ago.

Clinical parameters:

Clinical exams were performed at -15 days, baseline and two months after periodontal disinfection by only one trained and calibrated examiner. The probing pocket depth (PPD), relative clinical attachment level (rCAL) and bleeding on probing (BOP) were recorded at six sites per tooth (mesio-buccal, buccal, disto-buccal, mesio-lingual, lingual and disto-lingual) with the aid of a computerized periodontal probe^a. The presence or absence of biofilm at four sites per tooth (plaque index - PI)

^a Florida Probe®, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA

were also recorded ¹⁵. It was also verified the furcation involvement with the aid of a manual periodontal probe ^{*}.

Non-surgical periodontal therapy:

The scaling and root planning sessions were performed by the same operator in two to four sessions within 24- to 48-hour interval ¹⁶ using hand instruments[†] and an ultrasonic [‡] device while the subjects were under local anesthesia. Teeth presenting periapic radiolucencies and severe periodontal destruction were extracted. Oral hygiene was reviewed after a week and after a month of periodontal disinfection, followed by prophylaxis.

Disease activity:

Disease activity determination was adapted on a tolerance method ¹⁷. Active Sites were those which presented clinical attachment loss of ≥ 1 mm (considering the standard deviation of 0.3 mm for the electronic probe multiplied by 3) two months after initial clinical examination. Sites were considered inactive if presenting a PD equivalent to those of the active ones, but without any clinical attachment loss during the same period.

So, after two months, new periodontal examination was done to evaluate PI, BOP, PD and rCAL using a computerized probe to detect progressive sites.

Gingival crevicular fluid sampling:

Prior to gingival crevicular fluid collection, the supragingival plaque was removed. At baseline, 15 days and 2 months after therapy, gingival crevicular fluid samples were collected from three different sites: (i) inflamed sites (PD ≥ 5 mm and BOP after clinical exams at -15 days and baseline); (ii) non inflamed sites (PD ≤ 3 mm and without BOP after clinical exams at -15 days and baseline); (iii) and control sites (PD ≤ 3 mm and without BOP after clinical exams at -15 days and baseline). For matching comparison purpose, inflamed sites and non-inflamed sites were from the same subject (group PD).

^{*} Nabers, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA

[†] Gracey curettes, Hu-Friedy Instruments, Chicago, IL, USA

[‡] Cavitron, Dentsply, York, PA, USA

The sites were isolated with cotton rolls and gently air dried. Gingival crevicular fluid samples were collected with sterile Periopaper strips^{*} that were inserted into the gingival crevice until mild resistance was felt and left in place for 30 seconds. Mechanical irritation was avoided and strips visually contaminated with blood were discarded. After gingival crevicular fluid collection, strips were placed in Eppendorf vials and immediately frozen at -80°C until use.

Gingival biopsy:

Gingival tissue samples (epithelial and connective tissues) were removed from the same sites that gingival crevicular fluid was collected. These samples were immediately submerged into liquid nitrogen to be then preserved under -80°C for posterior RNA extraction and gene expression analysis of MMP-8, IL-10, VEGF, RANKL, OPG e TGF- β_1 .

RNA extraction:

Total RNA from biopsies was extracted using the Trizol reagent[†] according to the directions supplied by the manufacturer. Briefly, Trizol (1 ml/ mg tissue) was added to the biopsy, shaken for 30s and incubated at room temperature for 15 min. To each suspension, 0.25 ml of chloroform[‡] was added, vortexed and then centrifuged at 10,500 rpm by 15 min for 4°C. The aqueous phase was transferred to a new tube, to which 0,25 ml of 95% ethanol[§] was added. The suspension was transferred to the spin basket assembly of the kit^{**} and centrifuged at 10,500 rpm by 1 min for 4°C.

After wash solution process, addition of DNase and, then, DNase stop solution, two elutions were made with 25 μ l of RNA/DNase free. The concentration of RNA was determined from optical density at a wavelength of 260 nm and thus it stored under -80°C.

^{*} Oraflow Inc., Planviwe, NT, USA

[†] Invitrogen, Milan, Italy

[‡] Sigma, St Louis, MO, USA

[§] Sigma, St Louis, MO, USA

^{**} SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EUA)

cDNA Synthesis:

From 1 µg of total RNA, a strand of complementary DNA (cDNA) was synthesized through a reverse transcription reaction*, according to the directions supplied by the manufacturer. At the end of this reaction, cDNA was stored at -20°C for later use.

Real-time PCR:

The reactions were carried out in duplicates for each sample (inflammation and non-inflammation sites and control sites). For each PCR reaction in real time, we used: 5 µl of buffer†; 2,25 µl of cDNA synthesis reaction diluted and 0,5 µl of primers‡. Then, the reaction was performed on a real-time thermocycler§. Conditions of real time PCR were as follows: 2 minutes at 50°C (incubation), 20 seconds at 95°C (polymerase activation) and 40 cycles for amplification for 1 sec at 95°C (denaturation) and 20 sec at 60°C (annealing/extension). Following sample amplification, calculations were performed for this analysis.

Gingival crevicular fluid proteins analysis:

Gingival crevicular fluid samples were placed into 60 µl of sodium phosphate buffer** na 0,01 ml of Tween® 20††. The proteins levels were identified simultaneously using multiplex cytokine profiling assay, in the Luminex platform‡‡, which allows the simultaneous detection of multiple analytes in small sample size (~ 50 µl). For gingival crevicular fluid samples, the following proteins were analyzed: VEGF and IL-10. The assay was used according to the manufacturer's protocol.

For MMP-8 analyse, samples were assayed by Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). All ELISA procedures were carried out according to the manufacturer's instructions.

* RT² First Strand Kit, SABioscience (code C03), Frederick, MD, USA

† TaqMan® Fast Advanced Master Mix, Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA

‡ TaqMan®, Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA

§ StepOne PlusTM Real-Time PCR System, Life Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA

** Gibco, Life Technologies, Carlsbad, California, USA

†† USB Corporation, Cleveland USA

‡‡ LuminexTM xMAP, Luminex Corporation, Austin, TX, USA

Statistical analysis

Clinical parameters:

Data were grouped by average and their respective standard deviation for clinical parameters. Specific sites and individuals were considered for parametric or non-parametric statistical analysis when appropriated after normality test (Lilliefors). For intra-group comparison, before and after treatment, Wilcoxon test or t test was applied. For intergroup comparison, Mann-Whitney test or t test was applied. A significance level of 5% was adopted for all statistical analyses ($P < 0.05$).

Ginival crevicular fluid proteins:

For intra- and intergroup comparison, at baseline, 15 days and 2 months, Kruskal-Wallis test or ANOVA was applied.

Real Time PCR arrays:

The differential expression calculation was done by specific software for data analysis (RT² Profiler PCR Array Data Analysis, SuperArray, SABiosciences, Frederick, MD, USA). Relative gene expression normalization and quantification was performed by 2- $\Delta\Delta$ CT method (Livak and Schmittgen, 2001). This software also performed pair-wise comparisons among groups of experimental replicates and defined fold-change and statistical significant thresholds. Therefore, data were presented as a difference (fold regulation) in gene expression, which would be normalized by the geometric mean value of actin-beta (ACTB). Significance level was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Clinical findings

Twenty-seven patients were included in this study, 18 patients with chronic periodontitis and 9 patients were periodontal and systemically healthy. Demographics data are displayed in Table 1. There was a higher prevalence in women and Caucasians in the PD and control groups. The average age was lower in the control group and the number of teeth was higher in the same group. At baseline, PD and control groups had different mean values for clinical parameters (Table 1). After non-surgical periodontal therapy, PD group had a significant reduction in the clinical parameters that were evaluated ($p < 0.05$).

In the three different sites where gingival crevicular fluid samples were collected, our results showed significant differences between inflamed and non-inflamed sites for PD, rCAL and BOP, and inflamed and control sites for PD and PI ($p < 0.05$) (Table 2). 2436 sites from PD group were analyzed and classified as active and inactive sites. After periodontal therapy, 17% of total sites were classified as active ($p < 0.05$).

Gingival crevicular fluid proteins

Only VEGF, MMP-8 and IL-10 were quantified in gingival crevicular fluid samples collected at baseline, 15 days and 2 months (Figure 1). Our data showed higher total amount of VEGF in inflamed sites (11.43 pg) compared to non-inflamed sites (7.4 pg) 15 days after periodontal therapy ($p = 0.009$). There were no difference between baseline and 2 months. The total amount of IL-10 were higher in inflamed sites (0.29 pg) compared to non-inflamed sites (0.21 pg) and control sites (0.21 pg) after periodontal therapy ($p < 0.05$). There were no difference between 15 days and 2 months. The total amount of MMP-8 showed no significant difference between the groups.

Disease activity after periodontal therapy, based on tolerance method¹⁷, was related to total amount of biomarkers analyzed in gingival crevicular fluid. There was no significant difference in total amount of VEGF, MMP-8 e IL-10 between active and inactive sites.

mRNA expression

We examined the expression of RANKL, OPG, MMP-8, VEGF, IL-10 e TGF- β_1 in inflamed, non-inflamed and control sites after periodontal therapy. Comparisons between inflamed sites and non-inflamed sites, showed more expression of RANKL ($p < 0.001$), OPG ($p = 0.0194$), IL-10 ($p = 0.03$) e TGF- β_1 ($p < 0.05$). Control sites demonstrated more expression of OPG ($p < 0.001$) and TGF- β_1 ($p < 0.05$) when compared to non-inflamed sites and also was more expressed to OPG when compared to inflamed sites ($p < 0.0047$). However, inflamed sites had more expression of IL-10 when compared to control sites ($p = 0.026$). MMP-8 and VEGF showed no differences in expression (Figure 2).

Correlations

The Pearson correlation coefficient revealed a correlation in few cases. The clinical parameters (PD and rCAL) were correlated with gingival crevicular fluid levels of MMP-8, VEGF e IL-10, before and after periodontal therapy (Table 3). Before therapy, positive correlations were found between rCAL and levels of IL-10 in control sites ($r = 0.723$; $p=0.02$). However, levels of IL-10 were negatively correlated with rCAL in non-inflamed sites ($r = -0.58$; $p=0.01$). Negative correlations were found between PD and levels of MMP-8 in control sites ($r = -0.66$; $p=0.04$). After therapy, positive correlations were found between PD and levels of VEGF ($r = 0.521$; $p = 0.02$) and IL-10 ($r = 0.5276$; $p = 0.02$) in non-inflamed sites (Table 3).

The clinical parameters (PD and rCAL) also were correlated with relative expression of mRNA to RANKL, OPG, MMP-8, VEGF, TGF- β_1 e IL-10, before periodontal therapy. Negative correlations were found between PD and relative expression of TGF- β_1 in inflamed sites ($r = -0.706$; $p=0.004$) (Table 4).

DISCUSSION

In the present study, we analyzed clinical parameters and biomarkers in gingival crevicular fluid and gingival tissue of patients with diagnostic of chronic periodontitis and healthy patients aiming to identify progressive sites and biomarkers related to disease active. Samples were collected at baseline, 15 days and 2 months after periodontal therapy. As expected, our data showed significant difference in clinical parameters between PD group and control group at baseline. After periodontal therapy, the results showed significant difference in clinical parameters of PD group, presenting a reduction in PD ($0.7 \text{ mm} \pm 0.4$), rCAL gain ($0.9 \text{ mm} \pm 0.5$), and BOP and PI reductions ($37.1\% \pm 5$ e $27.2\% \pm 7.3$), respectively. These are in accordance with previous data that showed better clinical parameters after full mouth disinfection¹⁸⁻²⁰. However, other studies had better results after periodontal therapy consisted of scaling and root planning over a 3- to 4- week period^{21, 22}, maybe because of more sessions to finalize treatment and instructions on oral hygiene.

Periodontal disease activity is normally accepted as bone and attachment loss²³. Attachment loss episodes may be related to variations in inflammatory cells, stimulating more migration of monocytes/macrophage to actives sites compared to inactive sites²⁴. Periodontal disease activity has been associated to inflammatory

biomarkers²⁵⁻²⁷. Our results demonstrated that 17% of the total sites were classified as active, according to the tolerance method²³. But there were no significant difference in total amount of MMP-8, VEGF and IL-10 in gingival crevicular fluid of active sites compared to inactive sites. Furthermore, there was no association between bleeding on probe and disease activity. Although previous studies observed relation between bleeding on probe and disease activity²⁸, other authors showed results similar to ours²⁹.

Through biomarkers analyze in gingival fluid, we found elevated levels of IL-10 in inflamed sites (0.29 pg) compared to control sites (0.07 pg) before treatment. On the other hand, Goutoudi et al (2004)³⁰ observed that IL-10 total amounts were similar in diseased and non-diseased sites. Furthermore, IL-10 mRNA was more expressed in inflamed sites compared to non-inflamed and control sites, in accordance to some previous results³¹⁻³³. We also showed more expression of MMP-8 mRNA in control sites, but not significant.

It can be explained by the anti-inflammatory effect of IL-10 that decrease the expression of pro-inflammatory cytokines, like TNF-alfa, IL-1 β and matrix metalloproteinases (MMPs). Because of its protective function against bone loss, IL-10 inhibits MMPs³² through the up-regulation of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMPs) that are capable of inhibiting almost every member of the MMP family³⁴. Thus, the higher expression of IL-10 in inflamed sites may control the potential destructive of Th1 response and could account for the less severe forms of disease³¹, and consequently, lowering the expression of MMP-8 in inflamed sites.

MMP-8 has been associated to the initiation and progression of periodontitis, and reflects its severity^{34, 35}. Also, authors observed that MMP-8 represents 80% of total collagenase in gingival fluid of patients with chronic periodontitis³⁶. Activation of MMP-8 has been suggested to occur in a cascade of events, where reactive oxygen species and others MMPs play an important role³⁴. Detection of latent and active forms of MMP-8 in oral fluids may not necessarily correlate with periodontal disease progression, as the active form is associated with periodontitis, while the latent form is associated with gingivitis^{37, 38}. The time-resolved immunofluorometric assay (IFMA) has been used to detect active forms of MMP-8^{21, 37}. The antibodies used in IFMA detects PMN- and fibroblast type MMP-8 isotypes, and especially their active forms³⁷.

Our results demonstrated higher levels of MMP-8 in control sites compared to inflamed sites. It's possibly associated to the technique used to analyze the gingival fluid samples. The enzyme linked immune sorbent assay (ELISA) method detects all forms of MMP-8, latent or active³⁹. Therefore, we suggested that, as it probably not differentiated MMP-8 isotypes, the high levels after therapy may be related to the presence of active and also latent forms, making the association of the marker to disease diagnostic difficult. Nevertheless, studies demonstrated higher total amount and concentrations of MMP-8 in gingival crevicular fluid of chronic periodontitis patients compared to healthy patients, even by ELISA method^{18, 22}.

Associated to tissue destruction, alveolar bone loss is also characteristic of chronic periodontitis. The regulation of osteoclast activity is mediated by members of TNF receptor family RANK-OPG-RANKL⁴⁰. Our site-specific analyze presented higher expression of RANKL mRNA in inflamed sites compared to non-inflamed sites. Inflamed sites also had higher expression of OPG mRNA compared to non-inflamed sites. Therefore, the relative ratio RANKL/OPG mRNA had more expression in inflamed sites. Garlet et al. (2004) observed higher expression of RANKL mRNA in chronic periodontitis patient compared to healthy patients, as well as higher expression of IL-10 mRNA. The expression of OPG was also higher, but not significant. According to the authors, the higher expression of OPG could control the alveolar bone loss driven by RANKL, attenuating the progression and severity of the disease. The expression of RANKL and MMPs may result in tissue destruction and disease progression, whereas the higher expression of TIMPs and OPG possibly induced by IL-10, could be responsible for the control of the tissue destruction³².

Associated to these results, we found significant higher expression of TGF- β_1 mRNA in inflamed sites compared to non-inflamed sites. Dutzan et al (2012)⁴¹ observed higher expression of TGF- β_1 in healthy sites compared to periodontitis sites, which in our study has no significance. Unlike, we found more expression of TGF- β_1 mRNA in inflamed and control sites compared to non-inflamed sites, probably indicating the anti-inflammatory characteristic of TGF- β_1 in inflamed sites, promoting modulation of pro-inflammatory cytokines and stimulating the production of IL-1 receptor antagonist, which regulates anti-inflammatory and immunesuppressor activities⁴².

Regarding VEGF, we only found significant difference between inflamed sites (11.43 pg) and non-inflamed sites (7.38 pg) 15 days after therapy. Although not

significant, total amount of VEGF was higher in inflamed sites at baseline, 15 days and 2 months after therapy. It may suggest that, since gingival tissue samples were collected in sites that received periodontal therapy, it's unclear if VEGF levels are related to the disease pathologic process or to the wound healing process after therapy. Besides, the presence of VEGF in gingival fluid of healthy patients may reflect sub-clinical levels of inflammation, healing following bacterial assault or physiological angiogenesis in periodontal tissues ⁴³.

Before correlation analyze, the results showed positive correlation between total amount of IL-10 in gingival fluid and rCAL of control sites and negative correlation between the same cytokine and rCAL in inflamed sites, before therapy. After 2 months, we observed positive correlation between total amount of IL-10 and PD in non-inflamed sites. Levels of VEGF and MMP-8 have no correlations to clinical parameters, which is not according with some authors that showed correlation of MMP-8 and clinical parameters ^{18, 21}. TGF- β_1 mRNA showed negative correlation between PD and relative expression in inflamed sites before therapy. For the other gene, no correlation was found for clinical parameters, corroborating to Garlet et al (2004) ³².

Data obtained in this study indicated significant improvement in clinical parameters after 2 months of periodontal therapy. However, levels of inflammatory biomarkers evaluated here stayed unaltered in gingival crevicular fluid of inflamed and non-inflamed sites. It can proposed that non-surgical therapy short term results would improve clinical parameters, but the inflammation or wound healing process after therapy are still happening and masking important alterations.

Thus, we concluded that disease activity seems to be an event of relative low probability of occurrence, however, a small percentage of sites keeps showing progressive attachment loss even after basic periodontal therapy. The specific biomarkers used in this study may be helpful to detect inflammation but not to discriminate progressive active sites.

Acknowledgments

The study had the financial support of the Foundation for Research Support of São Paulo grant 2012/152657.

References

1. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1999;4:1-6.
2. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992;63:322-331.
3. Taba M, Jr., Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dental clinics of North America* 2005;49:551-571, vi.
4. Loos BG. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* 2005;76:2106-2115.
5. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol* 2000;71:1535-1545.
6. Jankovic D, Liu Z, Gause WC. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends in immunology* 2001;22:450-457.
7. Kumar MS, Vamsi G, Sripriya R, Sehgal PK. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *J Periodontol* 2006;77:1803-1808.
8. Sexton WM, Lin Y, Kryscio RJ, Dawson DR, 3rd, Ebersole JL, Miller CS. Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. *J Clin Periodontol* 2011;38:434-441.
9. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *Journal of molecular medicine* 2005;83:170-179.
10. Guneri P, Unlu F, Yesilbek B, et al. Vascular endothelial growth factor in gingival tissues and crevicular fluids of diabetic and healthy periodontal patients. *J Periodontol* 2004;75:91-97.
11. César-Neto JB, Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Sallum EA, Nociti FH. Smoking modulates interleukin-6:interleukin-10 and RANKL:osteoprotegerin ratios in the periodontal tissues. *J Periodontol Res* 2007;42:184-191.
12. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 2004;34:9-21.
13. Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2004;343:1-16.
14. Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, et al. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol* 2006;77:1863-1870.
15. O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol* 1972;43:38.
16. Mongardini C, van Steenberghe D, Dekeyser C, Quirynen M. One stage full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. I. Long-term clinical observations. *J Periodontol* 1999;70:632-645.
17. Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J Clin Periodontol* 1983;10:298-310.
18. Konopka L, Pietrzak A, Brzezinska-Blaszczyk E. Effect of scaling and root planing on interleukin-1beta, interleukin-8 and MMP-8 levels in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Periodontol Res* 2012;47:681-688.
19. Scharf S, Wohlfeil M, Siegelin Y, Schacher B, Dannewitz B, Eickholz P. Clinical results after nonsurgical therapy in aggressive and chronic periodontitis. *Clinical oral investigations* 2014;18:453-460.
20. Preus HR, Gunleiksrud TM, Sandvik L, Gjermo P, Baelum V. A randomized, double-masked clinical trial comparing four periodontitis treatment strategies: 1-year clinical results. *J Periodontol* 2013;84:1075-1086.
21. Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mantyla P, Ronka H, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2000;27:366-369.
22. Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuairi LR, et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2010;37:180-190.
23. Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. *J Clin Periodontol* 1983;10:257-265.
24. Zappa U, Simona C, Schappi P, Graf H, Espeland M. Episodic probing attachment loss in humans: histologic associations. *J Periodontol* 1990;61:420-426.
25. Vernal R, Chaparro A, Graumann R, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2004;75:1586-1591.

26. Reinhardt RA, Stoner JA, Golub LM, et al. Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis. *J Periodontol* 2010;81:251-259.
27. Hernandez M, Gamonal J, Tervahartiala T, et al. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. *J Periodontol* 2010;81:1644-1652.
28. Haffajee AD, Socransky SS, Lindhe J, Kent RL, Okamoto H, Yoneyama T. Clinical risk indicators for periodontal attachment loss. *J Clin Periodontol* 1991;18:117-125.
29. Timmerman MF, Van der Weijden GA, Abbas F, et al. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Longitudinal clinical data and prospective clinical and microbiological risk assessment. *J Clin Periodontol* 2000;27:932-942.
30. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 β and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *Journal of dentistry* 2004;32:511-520.
31. Garlet GP, Martins W, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontol Res* 2003;38:210-217.
32. Garlet GP, Martins W, Jr., Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004;31:671-679.
33. Napimoga MH, Nunes LH, Maciel AA, et al. Possible involvement of IL-21 and IL-10 on salivary IgA levels in chronic periodontitis subjects. *Scandinavian journal of immunology* 2011;74:596-602.
34. Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Annals of medicine* 2006;38:306-321.
35. Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontol Res* 1988;23:386-393.
36. Golub LM, Lee HM, Stoner JA, et al. Subantimicrobial-dose doxycycline modulates gingival crevicular fluid biomarkers of periodontitis in postmenopausal osteopenic women. *J Periodontol* 2008;79:1409-1418.
37. Sorsa T, Hernandez M, Leppilahti J, Munjal S, Netuschil L, Mantyla P. Detection of gingival crevicular fluid MMP-8 levels with different laboratory and chair-side methods. *Oral diseases* 2010;16:39-45.
38. Teles R, Sakellari D, Teles F, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol* 2010;81:89-98.
39. Knauper V, Kramer S, Reinke H, Tschesche H. Partial amino-acid sequence of human PMN leukocyte procollagenase. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 1990;371:733.
40. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289:1504-1508.
41. Dutzan N, Vernal R, Vaque JP, et al. Interleukin-21 expression and its association with proinflammatory cytokines in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2012;83:948-954.
42. Turner M, Chantry D, Katsikis P, Berger A, Brennan FM, Feldmann M. Induction of the interleukin 1 receptor antagonist protein by transforming growth factor- β . *European journal of immunology* 1991;21:1635-1639.
43. Booth V, Young S, Cruchley A, Taichman NS, Paleolog E. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *J Periodontol Res* 1998;33:491-499.

Table

Table 1 – Demographic and clinical data from Control and PD groups.

	Controls (n = 9)	Periodontal Disease (n = 18)	*P Value
Age (years; mean ± SD)	33.2 ± 7.82	48.1 ± 7.82	p = 0.001***
Female (%)	66.7%	72.2%	—
Caucasian (%)	100%	83.3%	—
Non-Caucasian (%)	0%	16.7%	—
N. teeth	27.4 ± 4.2	23.7 ± 2.6	0.007
PPD (mm)			
initial	2.2 ± 0.1	3.1 ± 0.6	p < 0.0001**
2 months	2.1 ± 0.1	2.4 ± 0.3	p = 0.0035**
p value	NS*	< 0.0001**	—
Delta (Δ)	0.1 ± 0.2	0.7 ± 0.4	p < 0.0001**
rCAL (mm)			
initial	8.3 ± 1.2	10.4 ± 1.2	p = 0.004***
2 months	8.0 ± 1.0	9.5 ± 0.9	p = 0.0007***
p value	NS**	0.0002*	—
Delta (Δ)	0.3 ± 0.3	0.9 ± 0.5	p = 0.0012**
PI (%)			
initial	11.1 ± 6.3	68.9 ± 21.5	p < 0.0001**
2 months	10.6 ± 6.0	31.8 ± 22.7	p = 0.0007***
p value	NS**	< 0.0001**	—
Delta (Δ)	0.5 ± 4.8	37.1 ± 25	p < 0.0001**
BOP (%)			
initial	16.7 ± 10.3	49.3 ± 12.8	p < 0.0001***
2 months	13.7 ± 7.7	27.2 ± 7.3	p = 0.0001**
p value	NS*	< 0.0001**	—
Delta (Δ)	3.1 ± 7.2	22.1 ± 13.3	p = 0.0005**

NS - non significant ($p > 0.05$).

Mean ± standard deviation.

* Wilcoxon test for intragroup comparisons.

** t test for intragroup comparisons and between two groups

*** Mann-Whitney test for comparisons between two groups at baseline and at 2-month evaluation.

Table 2 – Differences between inflamed, non-inflamed and control sites

	PD (mm)	rCAL (mm)	PI (%)	BOP (%)
Inflamed sites	1.93 ± 0.72	1.3 ± 0.82	46.3 ± 41.44	38.89 ± 32.84
Non Inflamed sites	0.6 ± 0.7 ^a	0.1 ± 1.0 ^a	22.2 ± 73.2	- 22.2 ± 42.8
Control sites	0.2 ± 0.4 ^a	0.4 ± 0.7	-11.1 ± 33.3 ^a	0.0 ^a

Mean ± standard deviation

Kruskal-Wallis test for comparison between inflammation, non-inflammation and control sites.

a: significantly lower than inflammation sites (p<0.05)

Table 3 – Correlation coefficients between clinical parameters and total amount of VEGF, MMP-8 and IL-10. Pearson correlation coefficient. * significant.

	Baseline			2 months		
	VEGF	MMP-8	IL-10	VEGF	MMP-8	IL-10
Inflamed						
PD	r = -0.306 p = 0.21	r = 0.1189 p = 0.63	r = -0.450 p = 0.06	r = -0.087 p = 0.72	r = -0.238 p = 0.34	r = -0.1309 p = 0.60
rCAL	r = 0.1391 p = 0.58	r = -0.234 p = 0.34	r = -0.422 p = 0.08	r = 0.0872 p = 0.73	r = -0.357 p = 0.14	r = 0.4158 p = 0.08
Non inflamed						
PD	r = -0.318 p = 0.19	r = 0.0235 p = 0.92	r = -0.132 p = 0.61	r = 0.521* p = 0.02	r = -0.328 p = 0.18	r = 0.5276* p = 0.02
rCAL	r = 0.1497 p = 0.55	r = 0.1949 p = 0.45	r = -0.58* p=0.01	r = -0.057 p = 0.82	r = -0.030 p = 0.90	r = -0.0068 p = 0.97
Control						
PD	r = 0.0492 p = 0.9	r = -0.66* p=0.04	r = 0.2607 p = 0.49	r = 0.2716 p = 0.47	r = -0.05 p = 0.89	r = -0.3127 p = 0.41
rCAL	r = -0.177 p = 0.64	r = 0.3314 p = 0.38	r = 0.723* p=0.02	r = 0.3292 p = 0.38	r = -0.139 p = 0.72	r = -0.55 p = 0.12

Table 4 - Correlation coefficients between clinical parameters and relative expression of VEGF, MMP-8, RANKL, OPG, TGF- β_1 and IL-10. Pearson correlation coefficient. * significant.

	VEGF	MMP-8	IL-10	RANK-L	OPG	TGF- β_1
	Inflamed sites					
PD	r = -0.036 p = 0.90	r = -0.073 p = 0.81	r = 0.0099 p = 0.97	r = 0.0488 p = 0.86	r = -0.174 p = 0.55	r = -0.70* p = 0.004
rCAL	r = -0.153 p = 0.59	r = 0.0833 p = 0.78	r = 0.3625 p = 0.20	r = 0.122 p = 0.67	r = 0.4497 p = 0.10	r = -0.118 p = 0.68
	Non-inflamed sites					
PD	r = -0.018 p = 0.95	r = 0.2119 p = 0.48	r = -0.128 p = 0.66	r = -0.329 p = 0.25	r = -0.146 p = 0.61	r = -0.037 p = 0.89
rCAL	r = 0.2239 p = 0.44	r = 0.1404 p = 0.64	r = 0.1926 p = 0.50	r = 0.0826 p = 0.77	r = 0.3168 p = 0.26	r = 0.0434 p = 0.88

Figure legends

Figure 1 – Total amount of VEGF, IL-10 and MMP-8 in gingival crevicular fluid of inflamed, non-inflamed and control sites, at baseline, 15 days and 2 months.

*ANOVA test; p = 0.009.

**Kruskal-Wallis test; p < 0.05.

Figure 2 – Relative mRNA expression of RANKL, OPG, MMP-8, VEGF, IL-10 and TGF- β_1 in inflamed, non-inflamed and control sites.

a: significant difference between inflamed and non-inflamed sites

b: significant difference between inflamed and control sites

c: significant difference between control and non-inflamed sites

Figure 3

Figure 4