

**ANA PAULA DE LIMA OLIVEIRA**

**EFEITO DA TERAPIA PERIODONTAL NAS CITOCINAS DO  
FLUIDO GENGIVAL CREVICULAR DE INDIVÍDUOS COM  
PERIODONTITE AGRESSIVA GENERALIZADA**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
BELO HORIZONTE  
2012**

**ANA PAULA DE LIMA OLIVEIRA**

**EFEITO DA TERAPIA PERIODONTAL NAS CITOCINAS DO  
FLUIDO GENGIVAL CREVICULAR DE INDIVÍDUOS COM  
PERIODONTITE AGRESSIVA GENERALIZADA**

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor.

Área de concentração: Periodontia

Orientação: Prof. Dr. José Eustáquio da Costa

Co-orientação: Prof. Dr. Ricardo Palmier Teles

Prof. Dr. Fernando de Oliveira Costa

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**BELO HORIZONTE**

**2012**

## **AGRADECIMENTOS**

Dr. Ricardo Palmier Teles, Dra. Flávia Teles e toda a equipe do Forsyth Institute;

Dr. José Eustáquio da Costa, Dr. Fernando de Oliveira Costa , Dr. Luis Otávio de Miranda Cota e todos os professores do curso de Periodontia da UFMG;

Dr. Marcelo de Faveri e toda a equipe da Universidade de Guarulhos-SP;

Dr. Marcelo José Barbosa Silva;

Todos os colegas da pós-graduação em Odontologia;

Familliares e amigos, em especial Nancy Veiga e Elida Salazar;

Faculdade de Odontologia da UFMG;

Forsyth Institute, Boston, MA, EUA;

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais;

CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Obrigado!

## RESUMO

A doença periodontal é uma reação inflamatória destrutiva onde alterações bacterianas e fatores do hospedeiro, inatos e adquiridos, determinam o grau de comprometimento dos tecidos de suporte dos dentes. A periodontite agressiva é um tipo específico de doença periodontal com características clínicas distintas, que parece estar relacionada a algum defeito da resposta imune. O objetivo do nosso estudo foi examinar as mudanças nos níveis de citocinas do fluido gengival crevicular (GCF) de indivíduos com periodontite agressiva generalizada (PAgG) após a terapia periodontal. Assim, vinte e quatro indivíduos com PAgG tiveram amostras de citocinas do fluido gengival coletadas e analisadas usando Luminex para sete citocinas: GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$ . Os indivíduos foram aleatoriamente designados para uma raspagem e alisamento radicular (RAR) somente, ou RAR mais amoxicilina sistêmica (500 mg) e metronidazol (400 mg) 3 vezes ao dia durante 14 dias. Os parâmetros clínicos e as citocinas do GCF foram medidos no início, 6 e 12 meses após a terapia periodontal. Verificou-se que houve reduções significativas nos níveis de IL-1 $\beta$  após 6 meses de acompanhamento, de IL-2 após 6 e 12 meses de acompanhamento e de GM-CSF após 12 meses de acompanhamento, além de um aumento nos níveis de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 após 12 meses de acompanhamento. A razão IL-1 $\beta$ /IL-10 também reduziu significativamente nas duas visitas de acompanhamento. Os resultados indicaram que a terapia periodontal reverteu parcialmente o desequilíbrio entre a IL-1 $\beta$  e IL-10. A redução de GM-CSF após a terapia implica que essa citocina pode estar associada à patogênese da PAgG.

*Palavras chave: Periodontite agressiva, Fluido crevicular gengival, Citocinas, Terapia periodontal.*

## ABSTRACT

To examine changes in levels of gingival crevicular fluid (GCF) cytokines, after periodontal therapy of generalized aggressive periodontitis (PAgG), twenty four PAgG subjects had GCF samples collected and analyzed using multiplex bead immunoassay for: GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$ . Subjects were randomly assigned to either scaling and root planing (SRP) alone or SRP plus systemic amoxicillin (500 mg) and metronidazole (400 mg) 3 times a day for 14 days. Clinical parameters and GCF cytokines were measured at baseline, 6 and 12 months after treatment. Differences over time were analyzed using Wilcoxon test and between groups using Mann-Whitney test. Reductions in GCF IL-2, GM-CSF and IL-1 $\beta$  and increases in GCF IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  were detected after therapy. When the mean change in GCF cytokines were compared between groups, differences were not significant. The results indicated that periodontal therapy partially reversed the imbalance between IL-1 $\beta$  and IL-10. The reduction of GCF GM-CSF after therapy implicates this cytokine in the pathogenesis of GAgP. There was no difference between therapies in changes of GCF cytokines.

*Keywords: cytokines; gingival crevicular fluid; periodontal disease; periodontal therapy.*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP –	Academia Americana de Periodontologia
AM -	Amoxicilina e Metronidazol
et al –	e outros
GCF–	Fluido gengival crevicular
GM-CSF –	Fator estimulador de colônia de granulócitos macrófagos
INF $\gamma$ –	Interferon $\gamma$
IL-1 $\beta$ –	Interleucina 1 $\beta$
IL-2 –	Interleucina 2
IL-4 –	Interleucina 4
IL-6 –	Interleucina 6
IL-8 –	Interleucina 8
IL-10 -	Interleucina 10
ml –	Mililitro
mm –	Milímetros
MMP –	Metaloproteinase
NIC –	Nível de inserção clínico
PA -	Periodontite agressiva
PAgG –	Periodontite agressiva generalizada
PS –	Profundidade de sondagem
PC –	Periodontite crônica
pg –	Picograma
NIC –	Nível de inserção clínica
RANTES -	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
RAR -	Raspagem e alisamento radicular
SS –	Sangramento à sondagem
TGF- $\beta$ –	Fator de transformação do crescimento beta
Th1 –	Célula “T helper” auxiliar 1
Th2 -	Célula “T helper” auxiliar 2
TNF- $\alpha$ –	Fator de necrose tumoral
$\mu$ l –	Microlitro

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	17
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E MONITORAMENTO CLÍNICO .....	18
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	19
3.3 AMOSTRAS DE FLUIDO GENGIVAL CREVICULAR.....	19
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS UTILIZANDO A METODOLOGIA LUMINEX .....	20
3.5 ANÁLISE DOS DADOS .....	22
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 COOPERAÇÃO DE INDIVÍDUOS.....	23
4.2 RESULTADOS CLÍNICOS.....	23
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
<b>TABELAS .....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURAS.....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>57</b>

# 1 INTRODUÇÃO

As reações inflamatórias e imunológicas ao biofilme dental representam características predominantes da gengivite e da periodontite. Estudos epidemiológicos têm mostrado que as patologias que afetam o periodonto estão entre as doenças crônicas mais comuns do ser humano, afetando de 5 a 30% da população adulta na faixa etária de 25 a 75 anos (GENCO et al., 2002).

A gengivite é uma reação inflamatória envolvendo apenas tecido mole que pode ser revertida com a instituição de medidas eficazes de higiene oral (LOE et al., 1965). Já a periodontite é uma reação inflamatória destrutiva, que afeta as estruturas de suporte dos dentes, incluindo cemento, osso alveolar e ligamento periodontal. A periodontite diferencia-se clinicamente da gengivite pela perda de inserção, que consiste na migração do epitélio juncional da gengiva ao longo da raiz do dente e reabsorção do osso alveolar. Esse processo inicia-se pela deposição de biofilme dental nos dentes e próximo à margem gengival. O biofilme dental é uma película granular composta por bactérias e seus produtos, células descamadas e um polímero extracelular (dextran), que se forma na superfície dental ou outras estruturas orais sólidas, constituindo uma entidade específica altamente variável de indivíduo para indivíduo (GIBBONS e VAN HOUTE, 1973; KOLENBRANDER et al., 2006).

Enquanto a inflamação gengival pode estar associada a um acúmulo não específico de biofilme dental, a perda de inserção e de osso alveolar, que são característicos da periodontite, parecem estar associadas a uma pequena população do número total de espécies bacterianas orais (SOCRANSKY et al., 1998). O conceito de especificidade microbiana na etiologia da doença periodontal fortaleceu-se com as pesquisas que associaram o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* com a periodontite juvenil localizada (PJJ) (NEWMAN et al., 1977). Posteriormente, estabeleceu-se a *Porphyromonas gingivalis* como um importante patógeno na periodontite crônica (SLOTS, 1977). Estudos de Moore et al., (1983) mostraram que, das 300 a 400 espécies bacterianas que podem habitar a cavidade bucal, apenas um grupo de microrganismos anaeróbios e microaerófilos Gram-negativos está associado à doença periodontal, dentre eles, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (*P.intermedia*), *Fusobacterium nucleatum* (*F.nucleatum*), *Tannerella forsythia*

(*T.forsythia*) e *Treponema denticola* (*T.denticola*) (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1994). O chamado “complexo vermelho”, descrito por Socransky e colaboradores (1998), composto por *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* é um colonizador tardio e sua presença está relacionada às comunidades clímax de biofilmes em sítios de doença periodontal em progressão (HOLT e EBERSOLE, 2005).

As bactérias liberam continuamente componentes da superfície celular na cavidade oral e no sulco gengival (KANTARCI et al., 2006; WILLIAMS e HOLT, 1985), e podem ter efeitos diretos ou indiretos nas células hospedeiras. Os efeitos diretos ocorrem quando a bactéria ou extrato bacteriano estimula diretamente uma célula a efetuar um conjunto de respostas tais como proliferação celular, produção de citocinas, quimiocinas e expressão de moléculas de adesão celular. Os efeitos indiretos acontecem com a ativação de células hospedeiras para a produção e liberação de mediadores inflamatórios e citocinas. Estes mediadores e citocinas, possuem uma potente atividade pró-inflamatória podem desempenhar papéis essenciais na amplificação local da resposta imune, bem como na degradação do tecido periodontal (DONGARI-BAGTZOGLU e EBERSOLE, 1996). Apesar das bactérias serem necessárias, esse indício não é suficiente para causar periodontite. As doenças periodontais são infecções multifatoriais, e fatores do hospedeiro tais como herança genética, resposta imunológica, hábito de fumar e outros fatores de risco são tão importantes quanto as bactérias na determinação do desenvolvimento e estado da doença periodontal (PAGE e KORNMAN, 1997). A complexa inter-relação entre alterações bacterianas e fatores do hospedeiro, inatos e adquiridos, determinam o resultado da doença periodontal (PAGE e BECK, 1997).

Embora as reações inflamatórias e imunológicas no periodonto possam parecer semelhantes às observadas em outras partes do organismo, a periodontite se diferencia de outras doenças infecciosas pelo fato dos patógenos permanecerem na superfície do dente e no ambiente da bolsa periodontal, determinando uma inflamação persistente (GENCO, 1992). Observa-se, também, que a destruição na periodontite, não se processa de uma forma linear em todos os sítios e sim através de um processo descontínuo, sítio-específico, com surtos de atividade de destruição e períodos de inatividade ou quiescência (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1994). As variações da atividade da doença periodontal poderiam representar uma impossibilidade transitória de defesa do hospedeiro por meio da resposta

inflamatória ou, pelo contrário, uma reação de tal magnitude que causaria mais dano do que proteção ao periodonto (TENG, 2003).

Em 1999, no Workshop Internacional para Classificação das Condições e Doenças Periodontais, ficou decidida a introdução dos termos Periodontite Crônica e Periodontite Agressiva, e o abandono dos termos anteriormente recomendados, Periodontite do Adulto e Periodontite de Início Precoce, considerando a incerteza sobre os limites de idade estabelecidos para o enquadramento a uma das formas clínicas da doença periodontal, e o fato da idade ser considerada um critério primário de classificação. A Periodontite Crônica (PC), segundo a nova classificação, caracteriza-se clinicamente por alteração de cor e textura gengivais, como vermelhidão e tumefação, maior tendência ao sangramento provocado pela sondagem na área do sulco/bolsa gengival e, geralmente, presença de placa e cálculo dentário. Além disso, os tecidos podem exibir uma resistência reduzida à sondagem (aumento da profundidade da bolsa clínica) e/ou retração tecidual. Radiograficamente pode ser reconhecida pelo esfumaçamento da crista óssea, no início, e pela redução da altura óssea alveolar, posteriormente (ARMITAGE, 1999). Essa perda óssea pode apresentar um contorno uniforme, denominado “horizontal”, ou um defeito angular, denominado “vertical”. É considerada uma doença de progressão lenta (BROWN e LOE, 1993). A Periodontite Agressiva (PA), abrange um grupo de periodontites com manifestações clínicas distintas acometendo crianças, adolescentes e adultos jovens e, se caracteriza pela idade precoce de aparecimento, taxa de progressão rápida e ausência de relação entre a quantidade de irritantes locais e o grau de destruição periodontal (ZAMBON et al., 1986). A compreensão atual da patogenia dessa forma clínica da doença implica em considerá-la uma infecção com uma microbiota altamente virulenta e/ou um alto nível de susceptibilidade do hospedeiro (PAGE e BECK, 1997).

Baseando-se nas evidências clínicas e histopatológicas existentes na época, tais como biópsias de animais e algumas amostras coletadas de adolescentes humanos, Page & Schroeder (1976) classificaram a progressão da inflamação gengival e periodontal em quatro estágios: inicial, precoce, estabelecido e avançado. As lesões iniciais e precoces representam histopatologicamente as fases iniciais da gengivite, na qual a reação inflamatória se caracteriza por um infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico, alteração de permeabilidade vascular e proliferação coronal de células epiteliais. Por refletir a histopatologia característica da gengivite

crônica, a lesão estabelecida apresenta um quadro próximo ao descrito para as lesões citadas, anteriormente. Contudo, o infiltrado inflamatório, além da presença de neutrófilos, tem uma população de leucócitos relacionados à inflamação crônica, como linfócitos T, B e macrófagos. A descrição histopatológica da lesão avançada reflete a progressão da gengivite para a periodontite, onde ocorre um aumento no número de plasmócitos no tecido conjuntivo, além de um grande número de linfócitos B e T. A migração de neutrófilos está reduzida, mas muitas destas células estão ativas no interior dos tecidos. Os macrófagos, por sua vez, continuam produzindo fatores, como metaloproteinases, prostaglandina E, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), que aumentam a destruição dos tecidos conjuntivo e ósseo. Este modelo de estudo ainda é útil para a exposição das alterações histopatológicas ocorridas na bolsa periodontal. Porém, a resposta imunoinflamatória na periodontite não deve ser vista como um processo unidimensional que leva à destruição, mas como um processo interativo que é constantemente ajustado às múltiplas necessidades locais e sistêmicas do organismo (KANTARCI et al., 2006; PAGE e BECK, 1997; TENG, 2003).

As células do sistema imune estão amplamente distribuídas pelo organismo e, quando necessário, podem ser recrutadas para o local da infecção. Este processo se manifesta como uma inflamação, e compreende três eventos principais: aumento de suprimento sanguíneo para a área afetada; aumento da permeabilidade vascular permitindo que mediadores de inflamação atinjam o local da infecção e intensa diapedese de leucócitos (ROBBINS et al., 2005). Entre os vários tipos celulares que fazem parte da resposta imunológica na lesão periodontal, os linfócitos T são particularmente importantes. Linfócitos são células capazes de reconhecer, especificamente, diferentes determinantes antigênicos. Eles podem ser divididos em grupos distintos por suas características morfológicas, funções e produtos proteicos (ROBBINS et al., 2005).

Linfócitos T são centrais na resposta imune seja por controlar a ativação de linfócitos B (células produtoras de anticorpos), de células acessórias e dos próprios linfócitos T ou por exercer função citotóxica direta lisando células que contenham o alvo antigênico (JACOBSEN, 2001). Os linfócitos T podem ser identificados pela expressão de marcadores característicos. Os linfócitos que expressam o marcador CD4 (linfócitos CD4<sup>+</sup>) têm a função de auxiliar às respostas imunes (T<sub>H</sub>) e os linfócitos CD8<sup>+</sup> são predominantemente citotóxicos. Linfócitos T CD4<sup>+</sup> se dividem em

duas sub-populações funcionalmente distintas de células, Th1 e Th2, sendo que sua distinção funcional é resultado de uma produção diferencial de citocinas (MOSMANN et al., 1986). Células Th1 que são, em geral, caracterizadas pela produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-2 (IL-2), estão associadas com inflamação e induzem resposta imune mediada por células. Células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, auxiliam a proliferação e diferenciação dos linfócitos B e estão associadas com resposta humoral. Em razão de suas principais citocinas, IFN- $\gamma$  e IL-4, agirem antagonicamente, há uma mútua regulação entre as respostas Th1 e Th2. Respostas imunes caracterizadas por altos níveis de IFN- $\gamma$  são, em geral, vantajosas em infecções por bactérias intracelulares e em alguns tipos de parasitas. Neste caso, funções dos macrófagos como fagocitose, secreção de citocinas e formação de radicais livres são benéficas. Entretanto, na presença de agentes extracelulares e helmintos, a resposta mediada por células parece assumir papel secundário. A resposta Th2, com altos níveis de IL-4 predomina no caso de helmintos, sendo mediada por anticorpos, sistema do complemento e neutrófilos ou por secreção de IgE e ativação de mastócitos, basófilos e eosinófilos. No entanto, o predomínio absoluto de um tipo de resposta representa uma possibilidade rara, principalmente em doenças cujas reações imunes podem causar destruição tecidual (KELSO, 1990; PALUDAN, 1998).

Nos últimos anos, vários estudos têm sugerido o envolvimento das células T na patogênese da doença periodontal, considerando-as centrais no controle da progressão da doença (YAMAZAKI e NAKAJIMA, 2004). Evidências indicam que a resposta de células T na doença periodontal está frequentemente comprometida e que este processo pode influenciar a progressão e gravidade da doença (GEMMELL et al., 1996). Células Th1 e Th2 podem individualmente ou combinadas regular a defesa do hospedeiro contra a infecção periodontal. (GEMMELL et al., 2002). As citocinas inflamatórias produzidas por células Th1 estão mais associadas a um processo de destruição tecidual ativa, enquanto citocinas com características anti-inflamatórias (IL-10, TGF- $\beta$ ) produzidas por células Th2 estão envolvidas na homeostasia tecidual e no subsequente processo de reparo tecidual (LAPPIN et al., 2001).

O paradigma Th1/Th2 foi usado como um modelo para explicar alguma das características da patogênese das infecções periodontais (TAUBMAN e KAWAI,

2001). Alguns autores sugerem que uma resposta predominante Th1 estaria associada a uma lesão inicial como descrito por Page & Schroeder em 1976, devido à presença de tipos celulares associados à hipersensibilidade do tipo tardia (Células T e Macrófagos) (YAMAMOTO et al., 1997). Inversamente, uma resposta Th2 resultaria em uma lesão avançada, com ativação de células B e a diferenciação em plasmócitos (GEMMELL et al., 1997).

Em resposta à microbiota subgingival, o hospedeiro libera citocinas inflamatórias e enzimas, que são responsáveis pela maior parte da degradação dos tecidos periodontais, levando aos sinais clínicos da doença (PRESHAW et al., 2008; SEYMOUR e GEMMELL, 2001). Vários destes marcadores biológicos podem ser detectados no fluido gengival crevicular (GCF), que é um meio conveniente para o diagnóstico e avaliação dos níveis de mediadores inflamatórios liberados durante a progressão da doença periodontal. Os níveis aumentados de diversas citocinas pró-inflamatórias no GCF, como a IL-1 $\beta$  (FIGUEREDO et al., 1999; GIANNOPOULOU et al., 2003a; MOMBELLI, 2003), IL-2 (LEE et al., 1995a; SALVI et al., 1998), INF- $\gamma$  (DUTZAN et al., 2009) e IL-8 (TELES et al., 2009a) têm sido associados com periodontite crônica e/ou agressiva. Inversamente, níveis aumentados da citocina anti-inflamatória IL-4 tem sido associados com a remissão ou melhoria de ambas as formas de periodontites crônica e agressiva (BASTOS et al., 2009; MOMBELLI, 2003). Em indivíduos com periodontite, níveis aumentados de IL-1 $\beta$  foram estreitamente associados com a gravidade da doença periodontal, podendo servir como um marcador de destruição dos tecidos (ISHIHARA et al., 1997). Muitas investigações nessa área concentraram-se na citocina IL-1 $\beta$ , devido à sua participação na iniciação e desenvolvimento da periodontite. A IL-1 $\beta$  é uma glicoproteína de 17 KDa produzida predominantemente por monócitos e macrófagos, mas também pode ser produzida por fibroblastos e células ósseas, sendo ainda induzida por microrganismos, produtos microbianos e agentes (HOROWITZ, 1993; MATSUKI et al., 1991, 1992), com propriedades pro inflamatórias potentes (TATAKIS, 1993). O papel de outras citocinas destrutivas na patogênese da doença periodontal como o TNF- $\alpha$  também tem sido investigados. Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória que juntamente com a IL-1 $\beta$  induzem a regulação de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais, estimulam a produção de quimiocinas que fazem o recrutamento de leucócitos circulantes para os locais de inflamação e induzem a expressão de outros mediadores inflamatórios

que potencializam a resposta inflamatória, como as prostaglandinas e MMPs (GRAVES e COCHRAN, 2003). A IL-1 $\beta$  também induz a diferenciação de osteoclastos e reabsorção óssea (GOWEN e MUNDY, 1986). Usando um modelo de primatas não humanos da doença periodontal, Delima et al. (2001), demonstraram que os antagonistas solúveis para IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram capazes de reduzir a perda de inserção do tecido conjuntivo e osso alveolar, o que sugere uma relação causa-efeito entre estes marcadores e doença periodontal.

O reconhecimento da especificidade do biofilme subgengival, da resposta do hospedeiro frente ao desafio microbiano e de diferentes formas de doenças periodontais tem levado pesquisadores e clínicos a um melhor entendimento desse processo patológico e, eventualmente, à elaboração de uma terapia periodontal direcionada à supressão dos microrganismos que as causam, e subsequente recolonização por microrganismos compatíveis com a saúde (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1992). Sendo assim, diversos protocolos terapêuticos, incluindo o uso de antimicrobianos, têm sido empregados de forma menos empírica e mais focada às diferentes infecções periodontais. Além disto, o acompanhamento microbiológico e imunológico de indivíduos, antes e após o tratamento, tem possibilitado uma melhor avaliação da eficácia da terapia periodontal empregada.

Normalmente, as doenças periodontais são tratadas através do debridamento mecânico, ou seja, raspagem e alisamento radicular (supra e subgengivalmente), para a remoção e desorganização do biofilme e cálculo das superfícies dentárias, e a maioria dos indivíduos com doença periodontal tem um resultado satisfatório quando instituído este tratamento, associado ao controle da higiene bucal e manutenção periódica (AXELSSON et al., 2004). Parâmetros, incluindo nível de inserção clínica (NIC), profundidade de sondagem (PS) e presença de sangramento à sondagem (SS) são comumente utilizados para avaliar e monitorar a condição periodontal. Sendo assim, o tratamento visa reduzir as profundidades de sondagem de bolsa, manter ou melhorar os níveis de inserção clínica e reduzir a incidência do sangramento (HEITZ-MAYFIELD et al., 2002).

A terapia periodontal mecânica é considerada fundamental para romper o biofilme e a justificativa para o uso adjuvante de antimicrobianos sistêmicos é reduzir a carga bacteriana possibilitando a resolução da inflamação na bolsa periodontal (HEITZ-MAYFIELD, 2009). Uma revisão sistemática de Herrera et al. (2002) concluiu que o uso de antibióticos sistêmicos associados à terapia mecânica pode oferecer

um benefício adicional sobre a terapia mecânica sem o uso de antibióticos, em termos de redução de profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica, em bolsas de 6 mm ou mais de profundidade. Resultados semelhantes foram relatados por Haffajee et al. (2003).

Do ponto de vista microbiológico e imunológico, o objetivo ideal da terapia periodontal é reduzir os níveis de patógenos aos existentes antes da instalação da doença, por períodos prolongados de tempo (TELES et al., 2006). Tal proposta visa simultaneamente reduzir os níveis de mediadores inflamatórios levando a uma melhora clínica do quadro. Alguns estudos avaliando o efeito do tratamento periodontal sobre os níveis de citocinas, sugerem que as citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , diminuem após a terapia, enquanto as anti-inflamatórias, como IL-10, aumentam (GOUTOUDI et al., 2004; ROSALEM et al., 2011).

A ação imunossupressora das citocinas IL-4 e IL-10 tem sido associada com a remissão ou a melhora pós tratamento de ambas as formas de periodontite crônica e agressiva (BASTOS et al., 2009; GIANNOPOULOU et al., 2003b; GOUTOUDI et al., 2004; PRADEEP et al., 2008). Diversos estudos têm correlacionado a redução dos níveis totais de IL-1 $\beta$  com a melhora clínica após terapia periodontal, tanto em paciente com periodontite crônica (GOUTOUDI et al., 2004; THUNELL et al., 2010; TUTER et al., 2001) como com periodontite agressiva (TOKER et al., 2008). Já em um estudo realizado com indivíduos brasileiros, tratados com terapia de raspagem apenas em uma sessão (grupo teste), ou em quatro sessões distintas, um quadrante por semana (grupo controle), a quantidade total de IL-1 $\beta$  diminuiu após 6 meses de terapia no grupo teste, enquanto os níveis de IL-10 aumentaram, tanto 3 meses, quanto 6 meses após a terapia periodontal no mesmo grupo (DEL PELOSO RIBEIRO et al., 2008).

Em um estudo anterior, (TELES et al., 2010) analisou parâmetros clínicos, dados microbiológicos e os níveis de citocinas em GCF de indivíduos com PAgG para procurar padrões de associação entre essas variáveis. Este estudo transversal mostrou que os indivíduos com PAgG tinham níveis estatisticamente significantes mais elevados da interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ( $p < 0,001$ ), fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) ( $p < 0,01$ ) no GCF e da razão IL-1 $\beta$ /IL-10 ( $p < 0,001$ ), além de maior proporção de espécies dos complexos vermelho e laranja em comparação com indivíduos com saúde periodontal. Concluiu-se que os diferentes perfis de biofilme subgengival foram associados com padrões distintos de

expressão de citocinas no GCF e que indivíduos com PAgG foram caracterizados por uma maior razão de IL-1 $\beta$ /IL-10 do que indivíduos com saúde periodontal, sugerindo que existe um desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatória na periodontite agressiva.

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi analisar as alterações nos níveis de citocinas no GCF nesses indivíduos com PAgG como resultado da terapia periodontal. Os dados aqui apresentados foram obtidos durante um ensaio clínico originalmente concebido e desenhado para comparar dois tratamentos periodontais: raspagem e alisamento radicular (RAR) somente e RAR com o uso concomitante de antibióticos sistêmicos. Em uma primeira abordagem, nós examinamos se a terapia periodontal, independentemente do tipo, resultaria em mudanças nos níveis de citocinas no GCF. Além disso, também foram exploradas as diferenças entre as duas terapias empregadas, com o objetivo de fortalecer nossas observações originais, analisando longitudinalmente o impacto da terapia sobre as citocinas no GCF que demonstraram uma associação com PAgG (ou seja, IL-1 $\beta$ , a GM-CSF e IL-10).

A literatura mostra diferentes resultados sobre o efeito da terapia periodontal nos níveis de marcadores no GCF, tanto no espectro de citocinas investigadas, quanto no tempo de monitoramento dos indivíduos após a terapia, que varia de 2 semanas a 6 meses. A maioria dos estudos relata uma diminuição no total de IL-1 $\beta$  e IL-8 no GCF após a terapia não cirúrgica. Outras citocinas e mediadores imunológicos, como TNF- $\alpha$ , MMP-8 e RANTES, também mostram uma tendência a diminuir após a terapia (GAMONAL et al., 2001). Diferenças na metodologia dos estudos tornam difíceis resultados conclusivos a respeito deste tema. Acreditamos que esse estudo fornecerá dados relevantes para o maior entendimento da etiopatogenia da doença periodontal, podendo, no futuro, direcionar novas possibilidades de intervenção.

## **2 OBJETIVOS**

Avaliar as alterações nos níveis de citocinas do fluido gengival crevicular (GCF) de indivíduos com periodontite agressiva generalizada (PAgG) após a terapia periodontal de raspagem e alisamento radicular - RAR - associados ou não com antibioticoterapia.

### **2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO**

1. Analisar o efeito da terapia periodontal associada ou não com a antibiótico terapia (Amoxicilina e Metronidazol) sobre as citocinas GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$  no GCF de indivíduos com periodontite agressiva generalizada (PAgG), 6 e 12 meses após a terapia.
2. Analisar o efeito da terapia periodontal associada ou não com a antibiótico terapia (Amoxicilina e Metronidazol) sobre a proporção de IL-1  $\beta$ /IL-10.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 População de estudo e monitoramento clínico

Trinta indivíduos com periodontite agressiva generalizada (PAgG) foram recrutados na clínica de periodontia da Universidade de Guarulhos (Guarulhos, SP, Brasil)(TELES et al., 2010). Os protocolos de estudo, incluindo o exame periodontal e a obtenção de amostras de GCF, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Clínica da Universidade Guarulhos. Cada indivíduo leu e assinou um consentimento informado antes de entrar no estudo. Para serem incluídos, os indivíduos com PAgG tinham que ter entre 18 e 30 anos de idade, no mínimo 20 dentes naturais e um mínimo de seis com pelo menos um sítio com profundidade de sondagem interproximal (PS)  $\geq 5$  mm e nível de inserção (NIC)  $\geq 5$  mm. O diagnóstico de PAgG foi baseado nos critérios estabelecidos pela Academia Americana de Periodontia (ARMITAGE, 1999) e exigiu a agregação familiar, ou seja, pelo menos outro membro da família com PAgG, ou com história de doença periodontal. Os indivíduos foram excluídos se eles apresentavam alguma condição sistêmica que influenciaria o curso da doença periodontal ou o tratamento, além de condições médicas que necessitassem de profilaxia antibiótica para procedimentos odontológicos de rotina. Indivíduos que fumavam ou fizeram uso de antibióticos nos últimos 3 meses foram excluídos. Mulheres grávidas ou amamentando também não participaram do estudo.

O acúmulo de placa (ausente/presente), vermelhidão gengival (ausente/presente), supuração (ausente/presente), sangramento a sondagem (ausente/presente), profundidade de sondagem (PS, mm) e nível de inserção clínica (NIC, mm) foram avaliados em seis sítios por dente sendo estes: méso-vestibular, vestibular, disto-vestibular, méso-lingual, lingual e disto-lingual. Todos os dentes presentes, excluindo os terceiros molares, foram avaliados por um examinador calibrado. PS e NIC foram registradas utilizando uma sonda periodontal modelo Carolina do Norte (Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA).

### **3.2 Desenho experimental**

Neste estudo clínico randomizado duplo-cego, os indivíduos foram divididos aleatoriamente usando uma tabela gerada por computador para um dos seguintes grupos de tratamento: RAR + placebo ou RAR + antibióticos. O protocolo de tratamento utilizado foi: 400 mg de metronidazol e 500 mg de amoxicilina três vezes ao dia (t.i.d) por 14 dias. Indivíduos no grupo RAR receberam duas cápsulas de placebo t.i.d por 14 dias. Para controlar o acúmulo de placa supragengival, todos os indivíduos foram instruídos a bochechar 15 ml de solução de clorexidina 0,12% (CHX) durante 1 min. duas vezes ao dia por 60 dias. O início do protocolo com placebo e antibióticos e o controle químico da placa foi imediatamente após a primeira sessão de instrumentação mecânica. A Farmácia da Universidade Guarulhos preparou as doses de antibiótico e placebo, utilizando cápsulas de forma e cor idênticas. Tanto os profissionais clínicos, quanto os indivíduos avaliados não sabiam qual tratamento foi atribuído durante o estudo. No início da terapia periodontal, foi realizado raspagem supragengival em toda a boca em todos os indivíduos. Nesse mesmo dia, os participantes desse estudo receberam instruções sobre técnicas adequadas de escovação. Para padronizar os grupos, os indivíduos receberam o mesmo dentifício para usar durante todo estudo (Colgate Total, Anakol Ind. Com. Ltda-Kolynos do Brasil - Colgate Palmolive Co., SP, Brasil). Todos os indivíduos receberam RAR em toda a boca, no prazo de 14 dias após a consulta inicial, realizada sob anestesia local, em consultas de aproximadamente 1 hora de duração cada. A RAR foi realizada por um único periodontista treinado, utilizando instrumentos manuais. Todos os indivíduos foram monitorados clinicamente e tiveram amostras de GCF coletadas no início, em seis e doze meses após a terapia. O estudo foi realizado entre julho de 2007 e setembro de 2009.

### **3.3 Amostras de Fluido Gengival Crevicular**

As amostras de fluido gengival crevicular (GCF) foram obtidas a partir do sítio méso-vestibular de cada dente presente (excluindo os terceiros molares), em dois quadrantes contralaterais, selecionados aleatoriamente. Após o isolamento relativo do local com rolos de algodão, a placa supragengival foi removida, o dente seco com

ar e a amostra do GCF foi coletada durante 30 segundos com papel-filtro (Periopapers, Interstate Drogas Exchange, Amityville, Nova Iorque, EUA). As tiras de Periopaper foram cuidadosamente inseridas de 1 a 2 mm na bolsa periodontal. O volume de fluido gengival crevicular foi determinado usando um Periotron 8000 (Oraflow Inc., Plainview, NY, EUA) calibrado, seguindo o protocolo descrito por (CHAPPLE et al., 1999). As amostras foram imediatamente colocadas em tubos Eppendorf no gelo e transportadas para o laboratório onde foram armazenados em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras de GCF foram coletadas antes das medidas clínicas e aquelas que estavam contaminadas com sangue foram descartadas. Todas as amostras foram enviadas congeladas para serem analisadas no Forsyth Institute em Cambridge–MA, USA.

### **3.4 Quantificação de citocinas utilizando a metodologia Luminex**

Os níveis de citocinas foram determinados utilizando um kit de alta sensibilidade denominado Millipore 7-plex (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA). Antes do ensaio, as amostras de GCF foram eluídas com 60  $\mu\text{l}$  de tampão fornecido no kit Millipore, vortexadas por 30 minutos, e centrifugadas por 10 min. a 10.000 rpm. Esse kit permitiu a dosagem das seguintes citocinas: GM-CSF, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Os ensaios foram realizados numa placa de 96 poços que contem uma membrana de filtração na sua base seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, microesferas revestidas com anticorpos monoclonais contra as sete citocinas analisadas foram adicionados aos poços da placa pré-umedecida. As amostras e padrões (entre 0,13 e 2000 pg / ml para cada análise) foram pipetados e incubados *overnight* a  $4^{\circ}\text{C}$ . Os poços foram lavados com um colector de vácuo (Millipore Corporation) e uma mistura de anticorpos secundários biotinilados foi adicionada. Após a incubação por 1 hora, estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente R-ficoeritrina (estreptavidina-PE) foi adicionada às esferas e incubado por 30 min. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foram adicionado aos poços e às microesferas uma solução tampão *sheath fluid* (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA) para serem analisadas no analisador de microesferas (Luminex 100™, Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA), que analisou a quantidade de fluorescência emitida pelas microesferas associadas a R-

ficoeritrina, relatada como a intensidade média de fluorescência. As concentrações desconhecidas das amostras (citocinas nas amostras do GCF) foram estimadas a partir da curva padrão, utilizando uma equação polinomial de terceira ordem e o software GraphPadPrism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA) e expressos em pg/ ml. As amostras abaixo do limite de detecção do ensaio foram registradas como zero enquanto que as amostras acima do limite superior da quantificação das curvas padrão foram atribuídos como o valor mais alto da curva.

O uso do sistema Luminex se justifica por sua capacidade de mensuração de várias citocinas numa mesma amostra de fluido. O Luminex 100 é um sistema de citometria de fluxo que utiliza 2 raios laser: um vermelho, que excita corantes internos nas microsferas e possibilita a distinção entre diferentes tipos de microsferas, e um verde, que excita o corante fluorescente utilizado na etapa de detecção. Cada uma das microsferas é coberta com anticorpos monoclonais de captura para um antígeno específico. Teoricamente, os ensaios multianalíticos de microsferas oferecem vantagens em relação aos tradicionais métodos de detecção colorimétricos uma vez que 100 substâncias podem ser analisadas de uma vez em cada amostra (VIGNALI, 2000). Quanto à sensibilidade, a leitura fluorescente do Luminex é mais direta, estável e sensível que a leitura colorimétrica do ELISA; além disso, os volumes de GCF recuperados das tiras de papel são geralmente muito pequenos, e os mediadores inflamatórios são encontrados em pequenas concentrações (pg/ml), o que torna a sensibilidade essencial. Em relação à reprodutibilidade, o Luminex apresenta valores de variabilidade intra e inter-ensaios menores que o ELISA. Já que o ensaio permite resultados por meio do cálculo da média de 100 microsferas, isto aumenta a confiabilidade e elimina a necessidade de correr amostras em duplicata. Pelo fato de evitar que seja feito um pool de amostras de fluido para que se consiga obter um volume adequado para análise, pode-se explorar melhor a relação entre citocinas, a quantidade e composição do desafio microbiano e as manifestações clínicas por sítio.

### 3.5 Análise dos dados

Os dados clínicos foram obtidos a partir de 6 sítios por dente para PS, NIC e SS no início do estudo, 6 e 12 meses. Os parâmetros clínicos médios foram determinados pela média de todos os sítios, de todos os dentes, em cada indivíduo e depois comparados entre os indivíduos de cada grupo clínico separadamente nas respectivas visitas de acompanhamento. Os valores médios e a média da porcentagem dos sítios com PS > 4mm e sangramento a sondagem também foram calculados. A significância das mudanças dos dados clínicos ao longo do tempo foi determinada utilizando o teste de Friedman para cada grupo clínico separadamente.

Os níveis das 7 citocinas no fluido gengival foram medidas em até 14 sítios por indivíduo. Os valores de todas as citocinas em cada indivíduo foram somados para calcular o nível total de citocinas. Os níveis de cada uma das 7 citocinas analisadas foram divididas pelo nível total de citocinas para calcular a proporção de cada citocina. Além disso, a razão entre os níveis de IL-1 $\beta$ /IL-10 também foi calculada. Os valores médios para cada parâmetro de citocinas foram então calculados para cada indivíduo e entre indivíduos em cada grupo clínico, em cada tempo separadamente. Para comparar os níveis de citocinas no início do estudo e aos 6 e 12 meses e os dados dos níveis de citocinas no GCF (pg / ml) em categorias de bolsas, < 4 mm, de 4-6 mm e > 6 mm, foi utilizado o teste de comparação múltipla de Dunn, e o teste de Dunnett para comparar os dados clínicos do início, com 6 e 12 meses. As variações médias obtidas para cada tratamento (RAR + placebo e RAR + Amoxiciclina/Metronidazol) foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney e as mudanças significativas ao longo do tempo nas citocinas do GCF foram determinadas através do teste de Wilcoxon para cada grupo, após 6 meses de terapia. Devido a um desequilíbrio na gravidade da doença periodontal entre os grupos clínicos, foi utilizado ANCOVA para ajuste dos valores de PS e NIC do início do estudo para confirmar as diferenças estatisticamente significantes obtidas para os valores não corrigidos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Cooperação de indivíduos

Ocorreram seis desistências durante o período experimental de 6 meses e 15 durante o período experimental de 12 meses. Estes indivíduos se mudaram para outras cidades e se recusaram a comparecer para as visitas de acompanhamento. Assim, um total de 24 indivíduos cooperaram com o estudo até 6 meses de acompanhamento: 12 no grupo controle (RAR + placebo) e 12 no grupo de teste (RAR + AM); e um total de 15 indivíduos cooperaram com o estudo até 12 meses: 7 no grupo controle (RAR + placebo) e 8 no grupo de teste (RAR + AM) . A Figura 1 apresenta o fluxograma do estudo. Para mais detalhes sobre comprometimento e eventos adversos ver Mestniket al. (2010).

### 4.2 Resultados Clínicos

A Tabela 1 apresenta a média demográfica e parâmetros clínicos ( $\pm$  SD) para os dois grupos clínicos no início do estudo e na visita de 6 meses de acompanhamento. Os dados demográficos mostram que os dois grupos estavam balanceados para a faixa etária e gênero. No entanto, o esquema de randomização resultou em um nível desequilibrado de gravidade da doença entre os grupos, como pode ser constatado estatisticamente pela média inicial de PS e NIC. O teste de Wilcoxon indicou que as reduções nas médias de PS, NIC, o percentual de SS e do número de sítios profundos com sangramento (ou seja PS > 4mm, SS +) foram estatisticamente significativas em ambos os grupos. Quando a mudança média dos parâmetros clínicos foi comparada entre os grupos, utilizando o teste de Mann-Whitney, verificou-se que o grupo que utilizou antibióticos teve redução estatisticamente significativa da PS ( $1,8 \pm 0,4$ ) e maior ganho de NIC ( $1,4 \pm 0,4$ ) em comparação ao grupo placebo ( $0,9 \pm 0,4$  e  $0,8 \pm 0,4$  para PS média e alterações NIC, respectivamente) (dados não mostrados). Além disso, a média do percentual de sítios profundos com sangramento no grupo de indivíduos tratados com antibióticos reduziu significativamente:  $40\% \pm 14$  versus  $28\% \pm 9$ . A redução média

do número de bolsas com sangramento > 4 mm não foi estatisticamente diferente entre os grupos clínicos. Devido às diferenças nas médias de PS e NIC no início do estudo, a significância estatística das comparações entre as alterações nos parâmetros clínicos para os dois grupos foi testada usando o ajuste inicial ANCOVA para a PS e NIC. Nos valores ajustados para PS média e alterações nos NIC a diferença estatisticamente significativa se manteve, mas a redução no percentual de sítios profundos com sangramento já não era significativa. A Tabela 2 apresenta as médias demográficas e parâmetros clínicos ( $\pm$  SD) para o total de indivíduos no início do estudo, na visita de 6 meses e na visita de 12 meses de acompanhamento. A redução nas médias de PS, NIC e o percentual de SS foram estatisticamente significativas tanto 6 quanto 12 meses após a terapia, quando comparados à visita inicial.

Um total de 895 amostras de GCF foram processadas como parte deste estudo: a frequência de detecção para cada uma das 7 citocinas no grupo de indivíduos saudáveis no início do estudo foi: GM-CSF, 85%; IL-2, 83%; IFN- $\gamma$ , 63%; IL-10, 99%; IL-6, 94%; IL-1 $\beta$ , 99%; and TNF- $\alpha$ , 98%. Enquanto no grupo de pacientes com Periodontite Agressiva no início do estudo foi: GM-CSF, 79%; IL-2, 79%; IFN- $\gamma$ , 69%; IL-10, 99%; IL-6, 94%; IL-1 $\beta$ , 100%; e TNF- $\alpha$ , 99% (TELES et al., 2010). As frequências de detecção seis meses após a terapia foram: GM-CSF, 83%; IL-2, 0%; IFN- $\gamma$ , 43%; IL-10, 95%; IL-6, 92%; IL-1 $\beta$  96%; e TNF- $\alpha$ , 96%. A Figura 2 apresenta os gráficos de distribuição da proporção média das 7 citocinas analisadas, dimensionados de acordo com os níveis de citocinas totais. O gráfico 2A representa a composição de citocinas no GCF no início do estudo, enquanto os gráficos seguintes representam a concentração de citocinas no GCF na visita de 6 meses (2B) e de 12 meses (2C). O teste de Dunn's revelou redução estatisticamente significativa nas percentagens de IL-2 e IL-1 $\beta$  nas visitas de 6 e 12 meses de acompanhamento, e de GM-CSF após 12 meses de acompanhamento, enquanto as percentagens de IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$  aumentaram significativamente após 6 e 12 meses de acompanhamento.

A Tabela 3 apresenta os níveis médios de citocinas no GCF (pg / ml) para os dois grupos clínicos (RAR + antibiótico e RAR + placebo) no início do estudo e na visita de 6 meses de acompanhamento. Quando os valores iniciais para os dois grupos foram comparados por meio de Mann-Whitney, não houve diferença estatisticamente significativa. Quando as mudanças ao longo do tempo foram

testadas estatisticamente usando Wilcoxon, verificou-se que, em ambos os grupos, houve redução significativa nos níveis de GM-CSF e da razão IL-1 $\beta$ /IL-10. Além disso, no grupo tratado com antibióticos, houve uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis médios de IL-1 $\beta$ .

A Tabela 4 apresenta os níveis médios de citocinas no GCF (pg / ml) para toda a população estudada ( n= 15) no início e nas visitas de 6 e 12 meses de acompanhamento. As variações nos níveis de citocinas após o tratamento foram analisadas usando o teste de comparação múltipla de Dunn, e verificou-se que houve reduções significativas nos níveis de IL-1 $\beta$  após 6 meses de acompanhamento, de IL-2 após 6 e 12 meses de acompanhamento e de GM-CSF após 12 meses de acompanhamento, além de um aumento nos níveis de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 após 12 meses de acompanhamento. A razão IL-1 $\beta$ /IL-10 também reduziu significativamente nas duas visitas de acompanhamento.

A Figura 3 apresenta a distribuição dos valores médios de citocinas no fluido gengival, para todos os indivíduos nos grupos RAR+Placebo e RAR+AM separadamente, seis meses após a terapia. Um certo grau de variabilidade ainda está presente, mas é evidente que a maioria dos indivíduos em ambos os grupos apresentaram diminuições em níveis médios de GM-CSF, IL-2 e IL-1 $\beta$ .

A Figura 4 apresenta a distribuição dos valores médios de citocinas no fluido gengival de todos os indivíduos que completaram 12 meses do estudo, onde a diminuição das citocinas GM-CSF, IL-2 e IL-1 $\beta$  continua evidente, e um aumento das citocinas IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$  pode ser observado na maioria dos indivíduos.

A tabela 5 apresenta os dados dos níveis de citocinas no GCF (pg / ml) examinados em categorias de bolsas < 4 mm, de 4-6 mm e > 6 mm. Na categoria < 4 mm, os níveis das citocinas GM-CSF, IL-2 e IL-1 $\beta$  apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa após 6 meses de terapia quando comparadas ao nível de citocinas no início do estudo, e apenas os níveis de GM-CSF e IL-2 mantiveram uma diminuição estatisticamente significativa após 12 meses de terapia. Os níveis das citocinas IL-6 e IL-10 apresentaram aumento estatisticamente significativo nestes sítios, após 12 meses de terapia quando comparadas ao nível de citocinas no início do estudo, sendo que o aumento de IL-10 também foi significativo quando comparado a 6 meses após a terapia. Na categoria de bolsas 4-6 mm, as citocinas IL-1 $\beta$  (após 6 meses), GM-CSF (após 12 meses) e IL-2 (após 6 e 12 meses)

apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa, enquanto as citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  apresentaram aumento estatisticamente significativo após 12 meses de terapia. Quando a categoria de bolsas > 6 mm foi analisada, apenas IL-2 apresentou uma diminuição estatisticamente significativa após 6 e 12 meses de terapia, e os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  também apresentaram aumento estatisticamente significativo após 12 meses de terapia. A média da razão IL-1 $\beta$ /IL-10 também teve diminuição estatisticamente significativa após o tratamento ( $p < 0,01$ ) nas categorias de bolsa < 4 mm e de 4-6 mm nas duas visitas de acompanhamento.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os níveis de citocinas no GCF em indivíduos com periodontite agressiva generalizada seis e 12 meses após a terapia periodontal associados ou não ao tratamento com amoxicilina e metronidazol. Como uma primeira abordagem, examinamos se terapia periodontal associada ou não com antibióticos resultaria em mudanças nas citocinas do GCF. Em seguida, avaliamos as diferenças dos parâmetros clínicos nos indivíduos com doença periodontal tratados com a terapia periodontal associada ou não com antibióticos. O objetivo era testar o impacto da terapia nos níveis de citocinas do GCF associadas com PAgG, baseando-se nas observações originais de que existiam diferenças nos perfis de citocinas do GCF entre saúde e doença periodontal.

A profundidade média de sondagem e a perda de nível clínico de inserção reduziram após a terapia sistêmica com antibiótico corroborando resultados publicados anteriormente (CIONCA et al., 2009; GUERRERO et al., 2005). O estudo de Machtei & Younis (2008) mostrou que o tratamento mecânico combinado com antimicrobianos reduz a PS média ( $0,74 \pm 0,1$  mm) e a média de perda de inserção ( $0,86 \pm 0,1$ mm), melhorando os parâmetros clínicos do indivíduo. É provável que o sucesso nos parâmetros clínicos esteja relacionado à uma diminuição nos níveis e proporções de bactérias do complexo vermelho e laranja no grupo tratado com antibióticos, conforme resultado apresentado por MESTNIK et al. (2010). Eles demonstraram que o tratamento com antibióticos reduziu os níveis de patógenos do complexo vermelho (*Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*) em aproximadamente 4 vezes mais quando comparado com o grupo não tratado, representando uma melhora no perfil microbiológico. Além disso, o tratamento mecânico associado com antibióticos reduziu significativamente as proporções dos patógenos do complexo laranja (*Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*). Tal fato não foi observado em indivíduos que receberam apenas RAR. Portanto, as alterações dos níveis de patógenos dos complexos vermelho e laranja causadas pelo uso do antibiótico podem estar relacionadas à redução da PS média e aumento do ganho de inserção.

No presente estudo, observou-se que o grupo tratado com antibióticos apresentou menor número de bolsas residuais profundas com sangramento

comparado ao grupo controle. Esse dado mostra que os indivíduos tratados com antibióticos possuem menor risco de progressão da doença periodontal e, conseqüentemente, da necessidade de uma nova intervenção uma vez que o critério de bolsas residuais com sangramento é um parâmetro utilizado para definir tal risco (RENVERT e PERSSON, 2002). Além disso, a terapia mecânica associada com antibióticos pode reduzir a necessidade de tratamento cirúrgico adicional. Essa afirmação está baseada nos estudos de Matuliene et al. (2008) em que indivíduos com mais de oito sítios com PS  $\geq$  5 mm representam um fator de risco adicional para a perda de inserção e perda do dente. Nesse contexto, o critério de indivíduos pós-tratamento apresentando bolsas residuais com PS  $\geq$  5 mm poderia ser usado como uma medida da necessidade de tratamento cirúrgico adicional. Por fim, dados publicados na literatura corroboram nossos resultados. Um estudo recente mostrou que a amoxicilina e metronidazol sistêmicos adjuvante à terapia mecânica resulta em baixa persistência de bolsas residuais com sangramento (CIONCA et al., 2009). Portanto, a terapia periodontal associada com antibióticos reduz a persistência de bolsas residuais o que sugere menor risco de progressão da doença periodontal.

Em um estudo anterior, Teles et al. (2010) demonstraram que a periodontite agressiva generalizada foi associada com maiores níveis de IL-1 $\beta$  e GM-CSF, além da maior relação IL-1 $\beta$ /IL-10 no GCF. Goutoudi et al. (2004) relataram o efeito da terapia periodontal cirúrgica nos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-10 no GCF. Os dados demonstraram a diminuição na quantidade total de IL-1 $\beta$ , enquanto os níveis de IL-10 mantiveram-se estáveis até 32 semanas após o tratamento. Eles concluíram que a periodontite foi associada com uma relação inversa entre a IL-1 $\beta$  e IL-10. Em um estudo recente avaliando o efeito do tratamento periodontal sobre os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-10 no GCF na periodontite agressiva generalizada, os dados demonstraram reduções estatisticamente significativas na IL-1 $\beta$ , enquanto a IL-10 manteve-se inalterada (TOKER et al., 2008). Nossos dados mostram que o tratamento periodontal resultou em diminuição estatisticamente significativa nos níveis de GM-CSF, na proporção de IL-1 $\beta$  e da razão IL-1 $\beta$ /IL-10 e um aumento na proporção de IL-10 após a terapia periodontal, independente do tratamento utilizado. Em contraste, Gamonal et al. (2000) relataram uma diminuição nos níveis de IL-10 no GCF como resultado da raspagem e alisamento radicular. Os resultados relatados na literatura estão de acordo com os dados atuais que demonstram uma diminuição dos níveis de IL-1 $\beta$  após o tratamento, o que sugere diminuição na reabsorção do

tecido ósseo alveolar (ENGBRETSON et al., 2002; ROSALEM et al., 2011; ZHONG et al., 2007). A IL-1 $\beta$  tem sido extensivamente investigada por ser uma das principais citocinas envolvidas na resposta imunológica celular e por ser responsável pela diferenciação de osteoclastos e ativação da reabsorção óssea (PRESHAW e TAYLOR, 2011). Vários estudos relataram níveis mais elevados de IL-1 $\beta$  no GCF em sítios com periodontite em relação a sítios saudáveis ou com gengivite (FIGUEREDO et al., 1999; LEE et al., 1995a; TELES et al., 2009b; TSAI et al., 1995). Nossos resultados confirmam esses resultados uma vez que os níveis dessa citocinas diminuíram apenas nos sítios rasos (< 4 mm) e médios (4-6 mm), fortalecendo a associação bem estabelecida entre a IL-1 $\beta$  e os parâmetros clínicos de doença periodontal. Já o aumento da IL-10 pode ser associado com a resolução ou regulação do processo inflamatório que se instala na bolsa periodontal uma vez que essa citocina é um inibidor da resposta Th1 por diminuir a produção de IFN- $\gamma$  (NAKAJIMA et al., 2005). Além disso, IL-10 suprime a produção de metaloproteinases, e aumenta a síntese de inibidores teciduais de metaloproteinases em macrófagos (CASSATELLA et al., 1994). Em infecções onde há uma forte resposta pró-inflamatória, a IL-10 modula a resposta imune inicial associada ao alto nível de infecção, para que os danos dessa resposta sejam minimizados durante a resolução do processo, sendo assim, benéfica para o hospedeiro (COUPER et al., 2008). GEMMELL E SEYMOUR (1998) sugeriram que a presença de uma percentagem de células T IL-10<sup>+</sup> elevada pode indicar uma lesão estável, enquanto uma percentagem baixa de células T IL-10<sup>+</sup> pode indicar uma lesão progressiva. No nosso estudo observamos um aumento nos níveis de IL-10, principalmente nas bolsas rasas (< 4 mm), o que sustenta esta teoria.

Quando os dados de citocinas foram expressos como proporção do total de citocinas medidas, ficou claro que a IL-10 aumentou como porcentagem do total, representando aproximadamente 50% de todas as citocinas quantificadas após o tratamento. Além disso, a terapia periodontal, independentemente do uso concomitante de antibióticos sistêmicos, resultou em uma redução estatisticamente significativa na razão IL-1 $\beta$ /IL-10. Portanto, nossos resultados demonstram que a reversão parcial da proporção IL-1 $\beta$ /IL-10 reflete uma melhora clínica dos indivíduos uma vez que nas bolsas rasas e médias os níveis de IL-1 $\beta$  estavam reduzidos .

A IL-6 é uma citocina sintetizada por fagócitos mononucleares, células endoteliais e fibroblastos em resposta a microrganismos e a outras citocinas como a

IL-1 e o TNF. Também é produzida por linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th2 (O'GARRA, 1998). A IL-6 pode atuar na reabsorção óssea estimulando a formação e ativação dos osteoclastos (PRESHAW e TAYLOR, 2011), e está relacionada com a síntese de colágeno, fibronectina e laminina em vários tipos celulares (SPONSEL et al., 1994). Geivelis et al. (1993) correlacionou a quantidade de IL-6 no fluido gengival com os parâmetros clínicos de indivíduos com doença periodontal crônica. O pesquisador encontrou uma correlação significativa entre a presença e quantidade de IL-6 com o índice de sangramento e com a profundidade de bolsa, sugerindo essa citocina como um possível indicador de doença periodontal. Wu et al. (2001), em uma análise semelhante, verificou os níveis de IL-6 no fluido gengival crevicular, antes e após o tratamento periodontal. Os autores observaram que os níveis de IL-6 diminuíram, assim como os índices clínicos periodontais, concluindo que raspagem e alisamento radicular podem afetar os níveis de IL-6 em sítios com periodontite. Nossos dados mostram um resultado contrário ao destes autores, pois observamos um aumento na proporção de IL-6 após o tratamento, tanto no grupo tratado somente com raspagem, quanto no grupo tratado com raspagem e antibióticos, e em todas as categorias de bolsas (rasas, médias e profundas). Embora a IL-6 seja um potente indutor da resposta de fase aguda, ela também tem propriedades anti-inflamatórias (BARTON, 1996), pois induz a síntese de glicocorticoides (RUZEK et al., 1997) e promove a síntese de IL-1ra (antagonista do receptor de IL-1). Ao mesmo tempo, IL-6 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como GM-CSF e IFN- $\gamma$  (BARTON, 1997), contribuindo para controlar a extensão da resposta inflamatória do tecido (MARTELLI-JUNIOR et al., 2003).

Os níveis de IFN- $\gamma$  não foram alterados após a terapia periodontal. Um estudo publicado recentemente encontrou resultados semelhantes (ROSALEM et al., 2011), enquanto outros autores relataram uma diminuição nos níveis de IFN- $\gamma$  após a terapia (DEL PELOSO RIBEIRO et al., 2008; THUNELL et al., 2010). A baixa frequência de detecção para esta citocina pode indicar que ela está presente em quantidades muito baixas no GCF e, portanto, não seria uma citocina de escolha para estudos desse tipo.

A redução significativa nos níveis de IL-2 se enquadra na nossa compreensão do seu papel na doença periodontal pois níveis elevados deste mediador foram relatados em estudos anteriores, em sítios periodontais ativos de indivíduos com

periodontite (LEE et al., 1995a; SALVI et al., 1998). Além disso, um estudo de THUNELL et al. (2010) relata uma diminuição nos níveis de IL-2 após a terapia periodontal. No entanto, uma limitação do presente estudo foi a baixa frequência de detecção e nossa incapacidade de detectar IL-2 no GCF após a terapia.

O GM-CSF é produzido principalmente por monócitos/ macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, desempenhando um papel essencial no desenvolvimento normal de neutrófilos. Tem sido mostrado que esta citocina pode prolongar a presença de neutrófilos nos tecidos gengivais de indivíduos com periodontite crônica, reduzindo a sua apoptose (GAMONAL et al., 2003), e esta sobrevivência prolongada de neutrófilos tem sido associada a uma resposta inflamatória maior (DIBBERT et al., 1999). No entanto, a presença de GM-CSF em GCF não tem sido extensivamente estudada e os estudos relatando esse mediador inflamatório em amostras do GCF de indivíduos com periodontite não encontraram diferenças entre os sítios saudáveis e doentes (THUNELL et al., 2010). Além disso, os autores não conseguiram encontrar uma alteração nos níveis de GM-CSF no GCF como consequência da terapia periodontal mecânica. No entanto, esse estudo difere consideravelmente do nosso nos seguintes aspectos: 1) a população de estudo envolveu seis indivíduos com periodontite crônica generalizada, 2) foram acompanhados por 6-8 semanas após a terapia periodontal inicial, e 3) o imunoensaio *multiplex* tinha uma menor sensibilidade com um limite inferior de detecção de 15,6 pg / ml em comparação a 0,13 pg / ml do presente estudo. No nosso estudo, os níveis de GM-CSF diminuíram consideravelmente após a terapia, e quando dividimos os dados em categorias de bolsas, observamos que esta diminuição ocorreu principalmente em bolsas rasas (< 4 mm) e médias (4-6 mm).

Estudos recentes têm sugerido que o uso sistêmico de antibióticos durante o tratamento periodontal de indivíduos "com periodontite de progressão rápida" resultou em mudanças no perfil de citocinas do GCF, que está associado com a melhora clínica (ATICI et al., 1998). No entanto, alguns estudos sobre os efeitos dos antibióticos como adjuvantes no tratamento da periodontite não conseguiram demonstrar um impacto adicional sobre marcadores biológicos no GCF quando comparados à terapia mecânica isolada (GIANNOPOULOU et al., 2006; MACHTEI e YOUNIS, 2008; MASCARENHAS et al., 2005). A comparação entre esses relatos e os nossos dados fica comprometida pelas diferenças metodológicas, tais como

tempo de acompanhamento, tipo de antibiótico e/ ou regime empregado, inclusão de indivíduos fumantes e marcadores biológicos avaliados.

O estudo de Ho et al. (2010) sugere que o uso da azitromicina poderia reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias no GCF, como IL-1 $\beta$ , IL-8 e TNF- $\alpha$  em indivíduos periodontalmente saudáveis. Os autores concluíram que esse efeito foi o resultado das propriedades anti-inflamatórias da azitromicina. De fato, outros antibióticos e quimioterápicos, tais como minociclina (GARRIDO-MESA et al., 2011), eritromicina (ROCHE et al., 1986) e ciprofloxacina (LAHAT et al., 2007) possuem propriedades anti-inflamatórias. Não encontramos na literatura consultada efeito anti-inflamatório para a Amoxicilina e o Metronidazol, portanto, as mudanças no perfil de citocinas associadas com o uso concomitante dos antibióticos utilizados em nossa pesquisa devem ser interpretadas como um resultado do efeito antimicrobiano dessas drogas. Um estudo recente analisou os resultados clínicos e microbiológicos do uso adjunto de metronidazol e amoxicilina sistêmica e os associou com a redução na proporção das espécies dos complexos vermelho e laranja, em comparação ao grupo placebo (MESTNIK et al., 2010).

Quando o efeito das duas terapias nos níveis de citocinas no GCF foi comparado entre si, nossos resultados não demonstraram qualquer diferença estatisticamente significativa. No entanto, no grupo utilizando antibióticos, a terapia foi associada redução significativa nos níveis de IL-1 $\beta$  e aumento na proporção de TNF- $\alpha$ , que não foram detectadas no grupo RAR + placebo. Quando os indivíduos foram analisados independente do tratamento efetuado após 12 meses da terapia, os níveis de TNF- $\alpha$  estavam estatisticamente elevados. Quando analisamos os níveis de TNF- $\alpha$ , nas categorias de bolsas rasas (< 4mm), médias 4-6 mm) e profundas (> 6 mm), observamos que o aumento nos níveis desta citocina ocorreu apenas nas bolsas profundas após 12 meses de terapia, o que provavelmente gerou o aumento nos dados das citocinas totais nos indivíduos após 12 meses de tratamento. Machtei & Younis (2008) não encontraram diferenças nos níveis de TNF- $\alpha$  entre os grupos tratados com doxicilina e amoxicilina e metronidazol, porém os níveis de TNF- $\alpha$  no grupo amoxicilina e metronidazol estavam ligeiramente aumentados 3 meses após terapia. Um estudo de Lee et al. (1995b), comparando sítios ativos com inativos após três meses de terapia, não encontrou diferenças nos níveis de TNF- $\alpha$ . Porém, os níveis de TNF- $\alpha$  aumentaram nos sítios inativos após a

terapia, quando comparados ao início do tratamento. Neste estudo os autores sugerem que o aumento de TNF- $\alpha$  pode ser um preditor da conversão de sítios inativos em sítios ativos.

O perfil de citocinas final obtido com a terapia antibiótica se aproxima de forma mais consistente com o conteúdo de citocinas no GCF de sítios periodontais saudáveis de indivíduos com saúde periodontal apresentado no estudo anterior (TELES et al., 2010).

## 6 CONCLUSÃO

Em resumo, nossos resultados apoiam a suposição de que os indivíduos com periodontite agressiva generalizada apresentam níveis alterados de citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  e da citocina anti-inflamatória IL -10, ambas consideradas um fator importante na progressão dessa doença. Os dados indicaram que a terapia periodontal reverteu parcialmente a razão IL-1 $\beta$ /IL-10 aos níveis observados na saúde periodontal. O grupo em uso de antibióticos apresentou uma mudança maior no perfil de citocinas no GCF após a terapia, se aproximando ao perfil de indivíduos saudáveis. Além disso, a redução dos níveis de GM-CSF como resultado da terapia periodontal sugere que esta citocina pode estar relacionada à patogênese da PAgG.

## REFERÊNCIAS

- ARMITAGE, G.C., Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, v. 4, p. 1-6, Dec. 1999.
- ATICI, K., YAMALIK, N., ERATALAY, K., ETIKAN, I., Analysis of gingival crevicular fluid intracytoplasmic enzyme activity in patients with adult periodontitis and rapidly progressive periodontitis. A longitudinal study model with periodontal treatment. *J Periodontol*, v. 69, p. 1155-1163, Oct. 1998.
- AXELSSON, P., NYSTROM, B., LINDHE, J., The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance. *J Clin Periodontol*, v. 31, p. 749-757, Sep. 2004.
- BARTON, B.E., The biological effects of interleukin 6. *Med Res Rev*, v. 16, p. 87-109, Jan. 1996.
- BARTON, B.E., IL-6: insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopathol*, v. 85, p. 16-20, Oct. 1997.
- BASTOS, M.F., LIMA, J.A., VIEIRA, P.M., MESTNIK, M.J., FAVERI, M., DUARTE, P.M., TNF-alpha and IL-4 levels in generalized aggressive periodontitis subjects. *Oral Dis*, v. 15, p. 82-87, Jan. 2009.
- BROWN, L.J., LOE, H., Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000*, v. 2, p. 57-71, Jun. 1993.
- CASSATELLA, M.A., MEDA, L., GASPERINI, S., CALZETTI, F., BONORA, S., Interleukin 10 (IL -10) upregulates IL -1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. *J Exp Med*, v. 179, p. 1695-1699, May 1. 1994.

- CHAPPLE, I.L., GARNER, I., SAXBY, M.S., MOSCROP, H., MATTHEWS, J.B.,  
Prediction and diagnosis of attachment loss by enhanced chemiluminescent  
assay of crevicular fluid alkaline phosphatase levels. *J Clin Periodontol*, v. 26,  
p. 190-198, Mar. 1999.
- CIONCA, N., GIANNOPOULOU, C., UGOLOTTI, G., MOMBELLI, A., Amoxicillin and  
metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of chronic  
periodontitis. *J Periodontol*, v. 80, p. 364-371, Mar. 2009.
- COUPER, K.N., BLOUNT, D.G., RILEY, E.M., IL-10: the master regulator of immunity  
to infection. *J Immunol*, v. 180, p. 5771-5777, May 1. 2008.
- DEL PELOSO RIBEIRO, E., BITTENCOURT, S., SALLUM, E.A., NOCITI, F.H., JR.,  
GONCALVES, R.B., CASATI, M.Z., Periodontal debridement as a therapeutic  
approach for severe chronic periodontitis: a clinical, microbiological and  
immunological study. *J Clin Periodontol*, v. 35, p. 789-798, Sep. 2008.
- DELIMA, A.J., OATES, T., ASSUMA, R., SCHWARTZ, Z., COCHRAN, D., AMAR, S.,  
GRAVES, D.T., Soluble antagonists to interleukin-1 (IL -1) and tumor  
necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental  
periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 28, p. 233-240, Mar. 2001.
- DIBBERT, B., WEBER, M., NIKOLAIZIK, W.H., VOGT, P., SCHONI, M.H., BLASER,  
K., SIMON, H.U., Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed  
neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in  
inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 13330-13335, Nov 9. 1999.
- DONGARI-BAGTZOGLU, A.I., EBERSOLE, J.L., Production of inflammatory  
mediators and cytokines by human gingival fibroblasts following bacterial  
challenge. *J Periodontal Res*, v. 31, p. 90-98, Feb. 1996.

- DUTZAN, N., VERNAL, R., HERNANDEZ, M., DEZEREGA, A., RIVERA, O., SILVA, N., AGUILLON, J.C., PUENTE, J., POZO, P., GAMONAL, J., Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, v. 80, p. 290-296, Feb. 2009.
- ENGBRETSON, S.P., GRBIC, J.T., SINGER, R., LAMSTER, I.B., GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol*, v. 29, p. 48-53, Jan. 2002.
- FIGUEREDO, C.M., RIBEIRO, M.S., FISCHER, R.G., GUSTAFSSON, A., Increased interleukin-1beta concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J Periodontol*, v. 70, p. 1457-1463, Dec. 1999.
- 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*, v. 71, p. 1535-1545, Oct. 2000.
- GAMONAL, J., ACEVEDO, A., BASCONES, A., JORGE, O., SILVA, A., Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodontal Res*, v. 36, p. 194-203, Jun. 2001.
- GAMONAL, J., SANZ, M., O'CONNOR, A., ACEVEDO, A., SUAREZ, I., SANZ, A., MARTINEZ, B., SILVA, A., Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, v. 30, p. 616-623, Jul. 2003.
- GARRIDO-MESA, N., CAMUESCO, D., ARRIBAS, B., COMALADA, M., BAILON, E., CUETO-SOLA, M., UTRILLA, P., NIETO, A., ZARZUELO, A., RODRIGUEZ-CABEZAS, M.E., GALVEZ, J., The intestinal anti-inflammatory effect of minocycline in experimental colitis involves both its immunomodulatory and antimicrobial properties. *Pharmacol Res*, v. 63, p. 308-319, Apr. 2011.

- GEIVELIS, M., TURNER, D.W., PEDERSON, E.D., LAMBERTS, B.L.,  
Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with  
destructive periodontal disease. *J Periodontol*, v. 64, p. 980-983, Oct. 1993.
- GEMMELL, E., CARTER, C.L., GRIECO, D.A., SUGERMAN, P.B., SEYMOUR, G.J.,  
P. gingivalis-specific T-cell lines produce Th1 and Th2 cytokines. *J Dent Res*,  
v. 81, p. 303-307, May. 2002.
- GEMMELL, E., MARSHALL, R.I., SEYMOUR, G.J., Cytokines and prostaglandins in  
immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease.  
*Periodontol 2000*, v. 14, p. 112-143, Jun. 1997.
- GEMMELL, E., SEYMOUR, G.J., Cytokine profiles of cells extracted from humans  
with periodontal diseases. *J Dent Res*, v. 77, p. 16-26, Jan. 1998.
- GEMMELL, E., WOODFORD, V., SEYMOUR, G.J., Characterization of T lymphocyte  
clones derived from *Porphyromonas gingivalis* infected subjects. *J Periodontal  
Res*, v. 31, p. 47-56, Jan. 1996.
- GENCO, R., OFFENBACHER, S., BECK, J., Periodontal disease and cardiovascular  
disease: epidemiology and possible mechanisms. *J Am Dent Assoc*, v. 133  
Suppl, p. 14S-22S, Jun. 2002.
- GENCO, R.J., Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J  
Periodontol*, v. 63, p. 338-355, Apr. 1992.
- GIANNOPOULOU, C., ANDERSEN, E., BROCHUT, P., PLAGNAT, D., MOMBELLI,  
A., Enamel matrix derivative and systemic antibiotics as adjuncts to non-  
surgical periodontal treatment: biologic response. *J Periodontol*, v. 77, p. 707-  
713, Apr. 2006.

- GIANNOPOULOU, C., CAPPUYNS, I., MOMBELLI, A., Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*, v. 30, p. 996-1002, Nov. 2003a.
- GIANNOPOULOU, C., KAMMA, J.J., MOMBELLI, A., Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *J Clin Periodontol*, v. 30, p. 145-153, Feb. 2003b.
- GIBBONS, R.J., VAN HOUTE, J., On the formation of dental plaques. *J Periodontol*, v. 44, p. 347-360, Jun. 1973.
- GOUTOUDI, P., DIZA, E., ARVANITIDOU, M., Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent*, v. 32, p. 511-520, Sep. 2004.
- GOWEN, M., MUNDY, G.R., Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon-gamma on bone resorption in vitro. *J Immunol*, v. 136, p. 2478-2482, Apr 1. 1986.
- GRAVES, D.T., COCHRAN, D., The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, v. 74, p. 391-401, Mar. 2003.
- GUERRERO, A., GRIFFITHS, G.S., NIBALI, L., SUVAN, J., MOLES, D.R., LAURELL, L., TONETTI, M.S., Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*, v. 32, p. 1096-1107, Oct. 2005.
- HAFFAJEE, A.D., SOCRANSKY, S.S., GUNSOLLEY, J.C., Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann Periodontol*, v. 8, p. 115-181, Dec. 2003.

- HEITZ-MAYFIELD, L.J., Systemic antibiotics in periodontal therapy. *Aust Dent J*, v. 54 Suppl 1, p. S96-101, Sep. 2009.
- HEITZ-MAYFIELD, L.J., TROMBELLI, L., HEITZ, F., NEEDLEMAN, I., MOLES, D., A systematic review of the effect of surgical debridement vs non-surgical debridement for the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 29 Suppl 3, p. 92-102; discussion 160-102, 2002.
- HERRERA, D., SANZ, M., JEPSEN, S., NEEDLEMAN, I., ROLDAN, S., A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, v. 29 Suppl 3, p. 136-159; discussion 160-132, 2002.
- HO, W., EUBANK, T., LEBLEBICIOGLU, B., MARSH, C., WALTERS, J., Azithromycin decreases crevicular fluid volume and mediator content. *J Dent Res*, v. 89, p. 831-835, Aug. 2010.
- HOLT, S.C., EBERSOLE, J.L., Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*, v. 38, p. 72-122, 2005.
- HOROWITZ, M.C., Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science*, v. 260, p. 626-627, Apr 30. 1993.
- ISHIHARA, Y., NISHIHARA, T., KUROYANAGI, T., SHIROZU, N., YAMAGISHI, E., OHGUCHI, M., KOIDE, M., UEDA, N., AMANO, K., NOGUCHI, T., Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. *J Periodontal Res*, v. 32, p. 524-529, Aug. 1997.

- JACOBSEN, J., Buccal iontophoretic delivery of atenolol.HCl employing a new in vitro three-chamber permeation cell. *J Control Release*, v. 70, p. 83-95, Jan 29. 2001.
- KANTARCI, A., HASTURK, H., VAN DYKE, T.E., Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol 2000*, v. 40, p. 144-163, 2006.
- KELSO, A., Frequency analysis of lymphokine-secreting CD4+ and CD8+ T cells activated in a graft-versus-host reaction. *J Immunol*, v. 145, p. 2167-2176, Oct 1. 1990.
- KOLENBRANDER, P.E., PALMER, R.J., JR., RICKARD, A.H., JAKUBOVICS, N.S., CHALMERS, N.I., DIAZ, P.I., Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000*, v. 42, p. 47-79, 2006.
- LAHAT, G., HALPERIN, D., BARAZOVSKY, E., SHALIT, I., RABAU, M., KLAUSNER, J., FABIAN, I., Immunomodulatory effects of ciprofloxacin in TNBS-induced colitis in mice. *Inflamm Bowel Dis*, v. 13, p. 557-565, May. 2007.
- LAPPIN, D.F., MACLEOD, C.P., KERR, A., MITCHELL, T., KINANE, D.F., Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clin Exp Immunol*, v. 123, p. 294-300, Feb. 2001.
- LEE, H.J., KANG, I.K., CHUNG, C.P., CHOI, S.M., The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 22, p. 885-890, Nov. 1995a.
- LEE, W., AITKEN, S., SODEK, J., MCCULLOCH, C.A., Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue

destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodontal Res*, v. 30, p. 23-33, Jan. 1995b.

LOE, H., THEILADE, E., JENSEN, S.B., Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol*, v. 36, p. 177-187, May-Jun. 1965.

MACHTEI, E.E., YOUNIS, M.N., The use of 2 antibiotic regimens in aggressive periodontitis: comparison of changes in clinical parameters and gingival crevicular fluid biomarkers. *Quintessence Int*, v. 39, p. 811-819, Nov. 2008.

MARTELLI-JUNIOR, H., COTRIM, P., GRANER, E., SAUK, J.J., COLETTA, R.D., Effect of transforming growth factor-beta1, interleukin-6, and interferon-gamma on the expression of type I collagen, heat shock protein 47, matrix metalloproteinase (MMP) -1 and MMP-2 by fibroblasts from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol*, v. 74, p. 296-306, Mar. 2003.

MASCARENHAS, P., GAPSKI, R., AL-SHAMMARI, K., HILL, R., SOEHREN, S., FENNO, J.C., GIANNOBILE, W.V., WANG, H.L., Clinical response of azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in smokers. *J Periodontol*, v. 76, p. 426-436, Mar. 2005.

MATSUKI, Y., YAMAMOTO, T., HARA, K., Interleukin-1 mRNA-expressing macrophages in human chronically inflamed gingival tissues. *Am J Pathol*, v. 138, p. 1299-1305, Jun. 1991.

MATSUKI, Y., YAMAMOTO, T., HARA, K., Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA) -expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology*, v. 76, p. 42-47, May. 1992.

- MATULIENE, G., PJETURSSON, B.E., SALVI, G.E., SCHMIDLIN, K., BRAGGER, U., ZWAHLEN, M., LANG, N.P., Influence of residual pockets on progression of periodontitis and tooth loss: results after 11 years of maintenance. *J Clin Periodontol*, v. 35, p. 685-695, Aug. 2008.
- MESTNIK, M.J., FERES, M., FIGUEIREDO, L.C., DUARTE, P.M., LIRA, E.A., FAVERI, M., Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 37, p. 353-365, Apr. 2010.
- MOMBELLI, A., Periodontitis as an infectious disease: specific features and their implications. *Oral Dis*, v. 9 Suppl 1, p. 6-10, 2003.
- MOORE, W.E., HOLDEMAN, L.V., CATO, E.P., SMIBERT, R.M., BURMEISTER, J.A., RANNEY, R.R., Bacteriology of moderate (c hronic) periodontitis in mature adult humans. *Infect Immun*, v. 42, p. 510-515, Nov. 1983.
- MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A., COFFMAN, R.L., Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, v. 136, p. 2348-2357, Apr 1. 1986.
- NAKAJIMA, T., UEKI-MARUYAMA, K., ODA, T., OHSAWA, Y., ITO, H., SEYMOUR, G.J., YAMAZAKI, K., Regulatory T-cells infiltrate periodontal disease tissues. *J Dent Res*, v. 84, p. 639-643, Jul. 2005.
- NEWMAN, M.G., SANDLER, M., ORMEROD, W., ANGEL, L., GOLDHABER, P., The effect of dietary Gantrisin supplements on the flora of periodontal pockets in four beagle dogs. *J Periodontal Res*, v. 12, p. 129-134, Mar. 1977.

- O'GARRA, A., Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, v. 8, p. 275-283, Mar. 1998.
- PAGE, R.C., BECK, J.D., Risk assessment for periodontal diseases. *Int Dent J*, v. 47, p. 61-87, Apr. 1997.
- PAGE, R.C., KORNMAN, K.S., The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, v. 14, p. 9-11, Jun. 1997.
- PAGE, R.C., SCHROEDER, H.E., Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*, v. 34, p. 235-249, Mar. 1976.
- PALUDAN, S.R., Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand J Immunol*, v. 48, p. 459-468, Nov. 1998.
- PRADEEP, A.R., ROOPA, Y., SWATI, P.P., Interleukin-4, a T-helper 2 cell cytokine, is associated with the remission of periodontal disease. *J Periodontal Res*, v. 43, p. 712-716, Dec. 2008.
- PRESHAW, P.M., NOVAK, M.J., MELLONIG, J., MAGNUSSON, I., POLSON, A., GIANNOBILE, W.V., ROWLAND, R.W., THOMAS, J., WALKER, C., DAWSON, D.R., SHARKEY, D., BRADSHAW, M.H., Modified-release subantimicrobial dose doxycycline enhances scaling and root planing in subjects with periodontal disease. *J Periodontol*, v. 79, p. 440-452, Mar. 2008.
- PRESHAW, P.M., TAYLOR, J.J., How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol*, v. 38 Suppl 11, p. 60-84, Mar. 2011.
- RENVERT, S., PERSSON, G.R., A systematic review on the use of residual probing depth, bleeding on probing and furcation status following initial periodontal

therapy to predict further attachment and tooth loss. *J Clin Periodontol*, v. 29 Suppl 3, p. 82-89; discussion 90-81, 2002.

ROBBINS, S., COTRAN, R., VINAY, K., Robbins Pathologic Basis of Disease, ed. 5. Philadelphia:Elsevier, 2005. p.

ROCHE, Y., GOUGEROT-POCIDALO, M.A., FAY, M., FOREST, N., POCIDALO, J.J., Macrolides and immunity: effects of erythromycin and spiramycin on human mononuclear cell proliferation. *J Antimicrob Chemother*, v. 17, p. 195-203, Feb. 1986.

ROSALEM, W., RESCALA, B., TELES, R.P., FISCHER, R.G., GUSTAFSSON, A., FIGUEREDO, C., Effect of Non-Surgical Treatment on Chronic and Aggressive Periodontitis: Clinical, Immunological and Microbiological Findings. *J Periodontol*, v., Feb 10. 2011.

RUZEK, M.C., MILLER, A.H., OPAL, S.M., PEARCE, B.D., BIRON, C.A., Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL) -6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med*, v. 185, p. 1185-1192, Apr 7. 1997.

SALVI, G.E., BROWN, C.E., FUJIHASHI, K., KIYONO, H., SMITH, F.W., BECK, J.D., OFFENBACHER, S., Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J Periodontal Res*, v. 33, p. 212-225, May. 1998.

SEYMOUR, G.J., GEMMELL, E., Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand*, v. 59, p. 167-173, Jun. 2001.

SLOTS, J., The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scand J Dent Res*, v. 85, p. 114-121, Jan-Feb. 1977.

- SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE, A.D., The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*, v. 63, p. 322-331, Apr. 1992.
- SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE, A.D., Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *Compend Suppl*, v., p. S684-685, 688-693; quiz S714-687, 1994.
- SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE, A.D., CUGINI, M.A., SMITH, C., KENT, R.L., JR., Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, v. 25, p. 134-144, Feb. 1998.
- SPONSEL, H.T., BRECKON, R., HAMMOND, W., ANDERSON, R.J., Mechanisms of recovery from mechanical injury of renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol*, v. 267, p. F257-264, Aug. 1994.
- TATAKIS, D.N., Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J Periodontol*, v. 64, p. 416-431, May. 1993.
- TAUBMAN, M.A., KAWAI, T., Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 12, p. 125-135, 2001.
- TELES, R.P., GURSKY, L.C., FAVERI, M., ROSA, E.A., TELES, F.R., FERES, M., SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE, A.D., Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 37, p. 313-323, Apr. 2010.
- TELES, R.P., HAFFAJEE, A.D., SOCRANSKY, S.S., Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol 2000*, v. 42, p. 180-218, 2006.

- TELES, R.P., LIKHARI, V., SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE, A.D., Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *J Periodontal Res*, v. 44, p. 411-417, Jun. 2009a.
- TELES, R.P., SAKELLARI, D., KONSTANTINIDIS, A., SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE, A.D., Application of the checkerboard immunoblotting technique to the quantification of host biomarkers in gingival crevicular fluid. *J Periodontol*, v. 80, p. 447-456, Mar. 2009b.
- TENG, Y.T., The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 14, p. 237-252, 2003.
- THUNELL, D.H., TYMKIW, K.D., JOHNSON, G.K., JOLY, S., BURNELL, K.K., CAVANAUGH, J.E., BROGDEN, K.A., GUTHMILLER, J.M., A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. *J Periodontal Res*, v. 45, p. 148-152, Feb. 2010.
- TOKER, H., POYRAZ, O., EREN, K., Effect of periodontal treatment on IL-1beta, IL-1ra, and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 35, p. 507-513, Jun. 2008.
- TSAI, C.C., HO, Y.P., CHEN, C.C., Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol*, v. 66, p. 852-859, Oct. 1995.
- TUTER, G., KURTIS, B., SERDAR, M., Interleukin-1beta and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels after phase I periodontal therapy in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, v. 72, p. 883-888, Jul. 2001.

- VIGNALI, D.A., Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods*, v. 243, p. 243-255, Sep 21. 2000.
- WILLIAMS, G.D., HOLT, S.C., Characteristics of the outer membrane of selected oral *Bacteroides* species. *Can J Microbiol*, v. 31, p. 238-250, Mar. 1985.
- WU, Y., ZHAO, C., ZHANG, J., [Interleukin-6 levels in the gingival crevicular fluid before and after periodontal treatment]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, v. 19, p. 99-101, Apr. 2001.
- YAMAMOTO, M., FUJIHASHI, K., HIROI, T., MCGHEE, J.R., VAN DYKE, T.E., KIYONO, H., Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. *J Periodontal Res*, v. 32, p. 115-119, Jan. 1997.
- YAMAZAKI, K., NAKAJIMA, T., Antigen specificity and T-cell clonality in periodontal disease. *Periodontol 2000*, v. 35, p. 75-100, 2004.
- ZAMBON, J.J., CHRISTERSSON, L.A., GENCO, R.J., Diagnosis and treatment of localized juvenile periodontitis. *J Am Dent Assoc*, v. 113, p. 295-299, Aug. 1986.
- ZHONG, Y., SLADE, G.D., BECK, J.D., OFFENBACHER, S., Gingival crevicular fluid interleukin-1beta, prostaglandin E2 and periodontal status in a community population. *J Clin Periodontol*, v. 34, p. 285-293, Apr. 2007.

## TABELAS

Tabela 1 - Média ( $\pm$ SD) demográfica e parâmetros clínicos para os dois grupos após 6 meses de terapia.

Parâmetro	RAR (n=12)		RAR+AM (n=12)	
	Início	6-meses	Início	6-meses
Idade (anos)	26 $\pm$ 3		27 $\pm$ 3	
% masculino	33		50	
PS (mm)	3.9 $\pm$ 0.5 <sup>†</sup>	2.9 $\pm$ 0.4 <sup>**†</sup>	4.4 $\pm$ 0.6 <sup>†</sup>	2.5 $\pm$ 0.2 <sup>**†</sup>
NIC (mm)	4.0 $\pm$ 0.5 <sup>†</sup>	3.2 $\pm$ 0.6 <sup>**</sup>	4.7 $\pm$ 0.8 <sup>†</sup>	3.1 $\pm$ 0.5 <sup>**</sup>
% SS	77 $\pm$ 18	17 $\pm$ 14 <sup>**</sup>	77 $\pm$ 18	10 $\pm$ 9 <sup>**</sup>
NDP	2.3 $\pm$ 2.8	3.0 $\pm$ 4.0	4.2 $\pm$ 4.0	4.3 $\pm$ 4.2
Bolsas >4 mm				
SS+ (%)	51 $\pm$ 15 (33)	7 $\pm$ 9 (5) <sup>**</sup>	60 $\pm$ 18 (42)	3 $\pm$ 5 (3) <sup>**</sup>

<sup>\*\*</sup>p<0.01, comparado ao início por meio do teste Wilcoxon

<sup>†</sup>p<0.05 entre grupos por meio do teste Mann-Whitney

RAR - Raspagem e alisamento radicular; AM - amoxicilina + metronidazol

SS - Sangramento à sondagem

PS - Profundidade de sondagem

NIC - Nível de inserção clínica

NDP - Número de dentes perdidos

Tabela 2 - Média ( $\pm$ SD) demográfica e parâmetros clínicos do *baseline*, 6 meses e 12 meses após a terapia.

Parâmetro	Amostra Total (N = 15)		
	Baseline	6-month	12 meses
Idade (anos)	26 $\pm$ 3		
% masculino	27		
PS (mm)	4.13 $\pm$ 0.60	2.74 $\pm$ 0.42 <sup>***</sup>	2.72 $\pm$ 0.41 <sup>***</sup>
NIC (mm)	4.14 $\pm$ 0.67	2.97 $\pm$ 0.47 <sup>***</sup>	3.00 $\pm$ 0.45 <sup>***</sup>
% SS	0.74 $\pm$ 0.18	0.16 $\pm$ 0.13 <sup>***</sup>	0.15 $\pm$ 0.11 <sup>***</sup>

<sup>\*\*\*</sup>p<0.001, comparado ao *baseline* por meio do teste de Dunnett

SS - Sangramento à sondagem

PS - Profundidade de sondagem

NIC - Nível de inserção clínica

Tabela 3 - Média ( $\pm$  DP) dos níveis de citocinas no GCF (pg / ml) para os dois grupos clínicos no início e 6 meses após a terapia.

	RAR (n=12)		RAR+AM (n=12)	
	Baseline	6-month	Baseline	6-month
GM-CSF (pg/ml)	<b>3.9 <math>\pm</math> 2.9</b>	<b>1.7 <math>\pm</math> 0.9*</b>	<b>4.6 <math>\pm</math> 1.5</b>	<b>1.6 <math>\pm</math> 1.2**</b>
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	0.8 $\pm$ 1.3	0.5 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.9	0.4 $\pm$ 0.4
IL-10 (pg/ml)	19.2 $\pm$ 10.9	24.4 $\pm$ 18.6	16.9 $\pm$ 7.0	20.9 $\pm$ 20.0
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	18.8 $\pm$ 10.4	10.1 $\pm$ 13.0	<b>19.7 <math>\pm</math> 9.9</b>	<b>7.9 <math>\pm</math> 15.2*</b>
IL-2 (pg/ml)	2.0 $\pm$ 2.7	ND	1.5 $\pm$ 2.1	ND
IL-6 (pg/ml)	4.4 $\pm$ 7.8	12.1 $\pm$ 21.6	2.0 $\pm$ 1.9	6.6 $\pm$ 7.4
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	2.2 $\pm$ 2.4	3.7 $\pm$ 5.2	1.5 $\pm$ 0.9	3.3 $\pm$ 3.5
IL-1 $\beta$ /IL-10	<b>2.4 <math>\pm</math> 1.6</b>	<b>0.6 <math>\pm</math> 0.7**</b>	<b>2.6 <math>\pm</math> 2.4</b>	<b>0.6 <math>\pm</math> 0.6**</b>

\*p<0.05, \*\*p<0.01, comparado ao início por meio do Wilcoxon rank sum test

†p<0.05 entre grupos por meio do teste de Mann-Whitney

GM-CSF, fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos; IL, interleucina; IFN, interferon; TNF, fator de necrose tumoral; GCF, fluido gengival crevicular; RAR, raspagem e alisamento radicular; AM, amoxicilina + metronidazol

ND – não detectado

Negrito indica diferença estatisticamente significativa entre o início e após 6 meses

Tabela 4 - Média ( $\pm$  SD) dos níveis de citocinas no GCF (pg/ml) para todos os indivíduos que completaram o estudo do início aos 12 meses após a terapia.

	Amostras Totais (N = 15)		
	Início	6 meses	12 meses
GM-CSF (pg/ml)	<b>4.59 <math>\pm</math> 1.97</b>	1.82 $\pm$ 1.06	<b>1.21 <math>\pm</math> 0.69***</b>
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	0.74 $\pm$ 1.18	0.41 $\pm$ 0.34	1.12 $\pm$ 3.47
IL-10 (pg/ml)	<b>19.57 <math>\pm</math> 11.25</b>	29.13 $\pm$ 22.25	<b>38.74 <math>\pm</math> 23.13**</b>
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	<b>20.75 <math>\pm</math> 11.65</b>	<b>11.93 <math>\pm</math> 18.66**</b>	12.59 $\pm$ 11.53
IL-2 (pg/ml)	<b>1.96 <math>\pm</math> 2.45</b>	<b>0.00 <math>\pm</math> 0.00***</b>	<b>0.00 <math>\pm</math> 0.00***</b>
IL-6 (pg/ml)	<b>2.44 <math>\pm</math> 5.22</b>	10.58 $\pm$ 15.89	<b>15.86 <math>\pm</math> 22.61**</b>
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	<b>2.00 <math>\pm</math> 2.32</b>	5.44 $\pm$ 6.94	<b>7.68 <math>\pm</math> 12.69**</b>
IL-1 $\beta$ /IL-10	<b>2.41 <math>\pm</math> 2.46</b>	<b>0.47 <math>\pm</math> 0.35***</b>	<b>0.91 <math>\pm</math> 1.67*</b>

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 comparado ao início por meio do teste de Dunn.

GM-CSF, fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos; IL, interleucina; IFN, interferon; TNF, fator de necrose tumoral; GCF, fluido gengival crevicular; RAR, raspagem e alisamento radicular;

Negrito indica diferença estatisticamente significativa entre o início e após 6 ou 12 meses.

Tabela 5 - Níveis de citocinas ( $\pm$  SD) no GCF (pg / ml) examinados em categorias de bolsas < 4mm, de 4-6 mm e > 6mm para os indivíduos que completaram o estudo do início aos 12 meses após a terapia.

	<4mm			4-6mm			>6mm		
	Início	6 meses	12 meses	Início	6 meses	12 meses	Início	6 meses	12 meses
GM-CSF (pg/ml)	4.0 $\pm$ 2.0	<b>1.3 <math>\pm</math> 1.0**</b>	<b>1.2 <math>\pm</math> 0.9*</b>	4.7 $\pm$ 2.5	2.0 $\pm$ 1.2	<b>1.1 <math>\pm</math> 0.6***</b>	4.7 $\pm$ 4.5	1.9 $\pm$ 1.2	1.6 $\pm$ 1.1
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	0.4 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 3.2	1.07 $\pm$ 2.2	0.4 $\pm$ 0.4	0.358 $\pm$ 0.704	0.5 $\pm$ 0.7	0.3 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 6.9
IL-10 (pg/ml)	17.7 $\pm$ 10	19.5 $\pm$ 18	<b>38.5 <math>\pm</math> 31.4*†</b>	22.4 $\pm$ 17.7	30.9 $\pm$ 25.5	34.9 $\pm$ 19.1	12.9 $\pm$ 11.6	31.9 $\pm$ 28.7	41.8 $\pm$ 34.8
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	17.1 $\pm$ 12	<b>5.2 <math>\pm</math> 11**</b>	6.35 $\pm$ 9.4	22.3 $\pm$ 13.1	<b>11.3 <math>\pm</math> 17*</b>	12.9 $\pm$ 13.2	18.3 $\pm$ 15.1	23.3 $\pm$ 41.1	16.6 $\pm$ 21.3
IL-2 (pg/ml)	1.7 $\pm$ 2.5	<b>0.0 <math>\pm</math> 0.0***</b>	<b>0.0 <math>\pm</math> 0.0***</b>	1.9 $\pm$ 2.6	<b>0.0 <math>\pm</math> 0.0***</b>	<b>0.0 <math>\pm</math> 0.0***</b>	2.2 $\pm$ 3.1	<b>0.0 <math>\pm</math> 0.0**</b>	<b>0.0 <math>\pm</math> 0.0**</b>
IL-6 (pg/ml)	1.4 $\pm$ 1.6	5.15 $\pm$ 8.0	<b>17.3 <math>\pm</math> 23.6**</b>	3.3 $\pm$ 7.5	14.1 $\pm$ 25.7	<b>13.8 <math>\pm</math> 17.6*</b>	0.9 $\pm$ 0.7	8.6 $\pm$ 11.7	<b>21.7 <math>\pm</math> 33.5**</b>
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	1.8 $\pm$ 1.7	2.5 $\pm$ 3.4	7.7 $\pm$ 15,0	2.3 $\pm$ 2.9	6.9 $\pm$ 11	<b>6.0 <math>\pm</math> 6.5*</b>	0.9 $\pm$ 0.6	5.6 $\pm$ 4.5	<b>9.7 <math>\pm</math> 15.6**</b>
IL-1/IL-10	1.6 $\pm$ 2.0	<b>0.3 <math>\pm</math> 0.3*</b>	<b>0.2 <math>\pm</math> 0.3***</b>	2.6 $\pm$ 2.9	<b>0.5 <math>\pm</math> 0.4***</b>	<b>1.5 <math>\pm</math> 3.3**</b>	3.2 $\pm$ 3.1	0.6 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 1.6

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 comparado ao início por meio do teste de Dunn.

GM-CSF, fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos; IL, interleucina; IFN, interferon; TNF, fato de necrose tumoral; GCF, fluido gengival crevicular; RAR, raspagem e alisamento radicular; Negrito indica diferença estatisticamente significativa entre o início e após 6 e 12 meses.

## FIGURAS

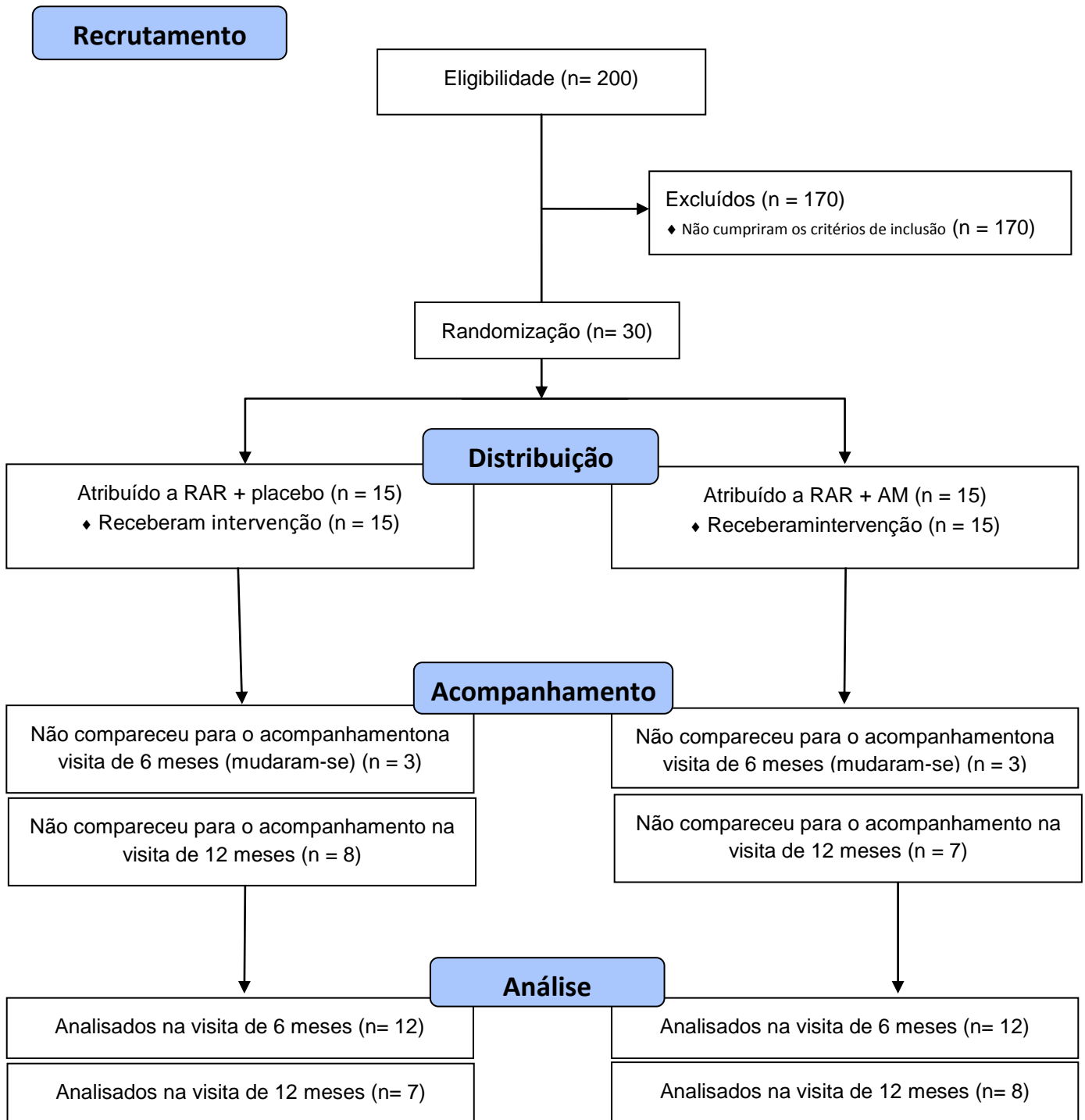


Figura 1—Representação esquemática do processo de seleção de indivíduos para o estudo.

Figura 2 - Gráfico de pizza que ilustra a proporção média das 7 citocinas nos indivíduos que completaram os 12 meses de acompanhamento.

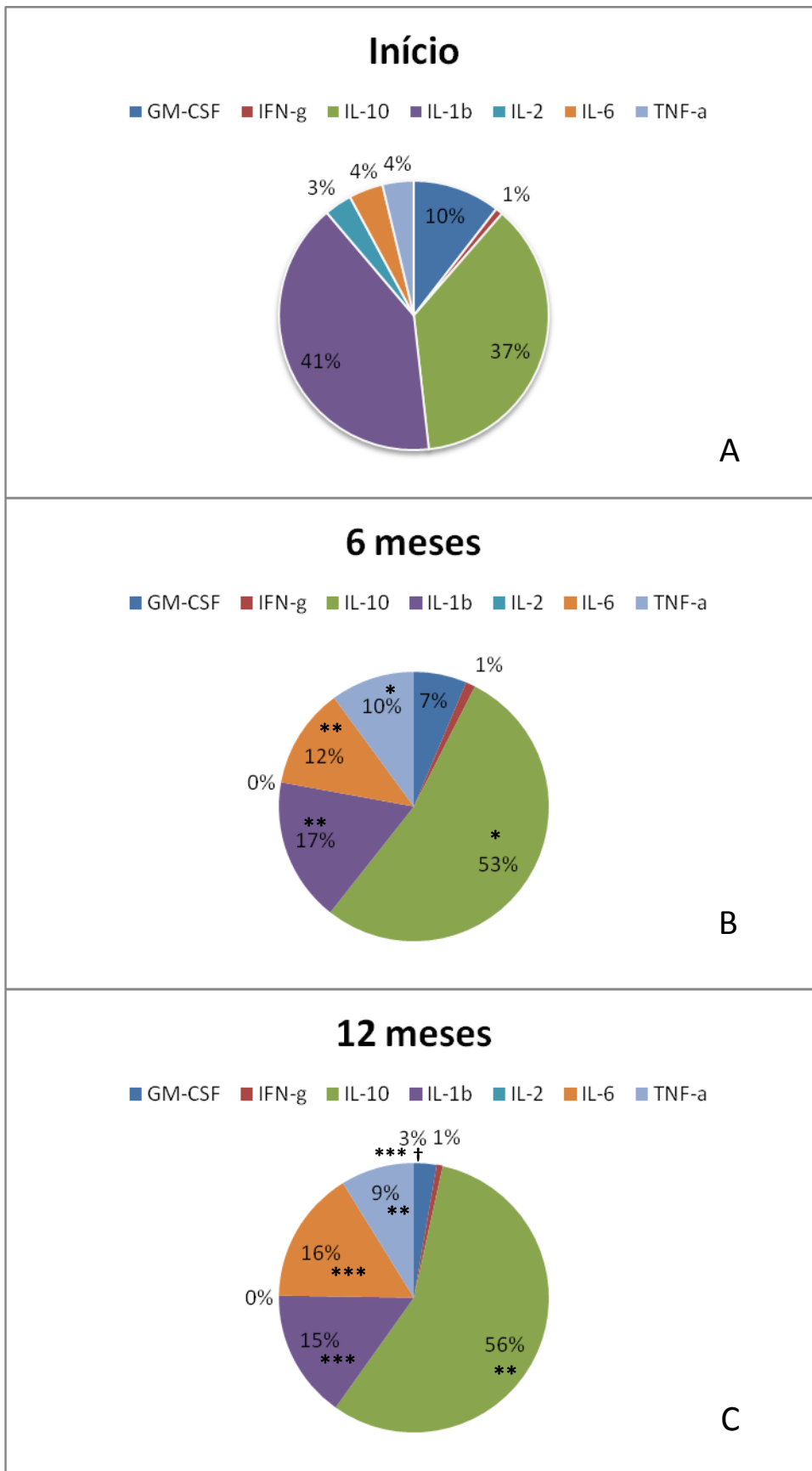
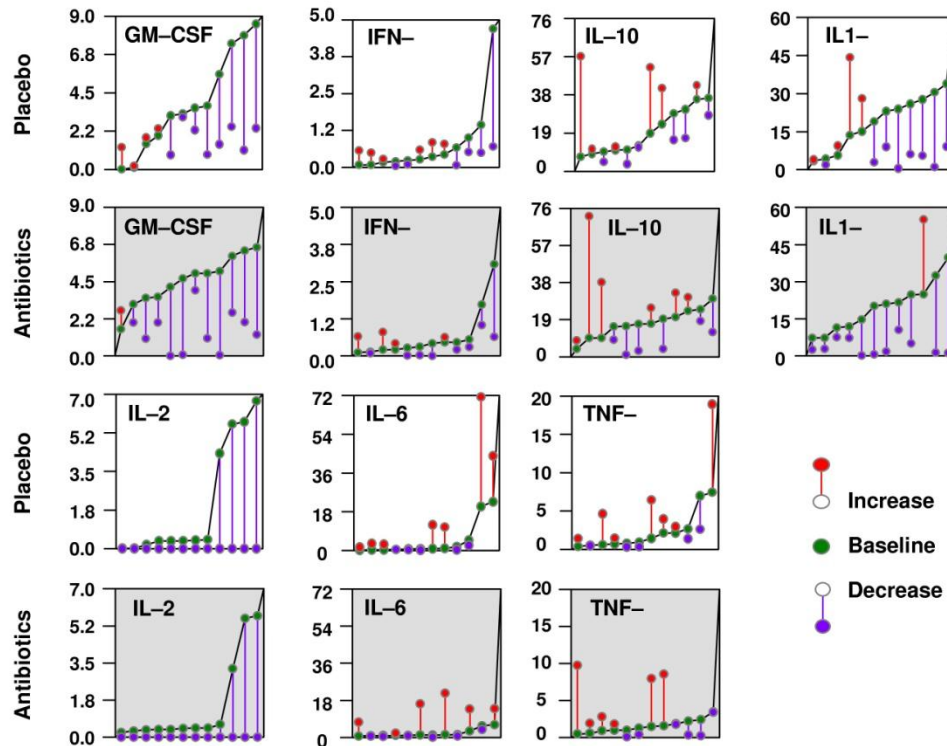


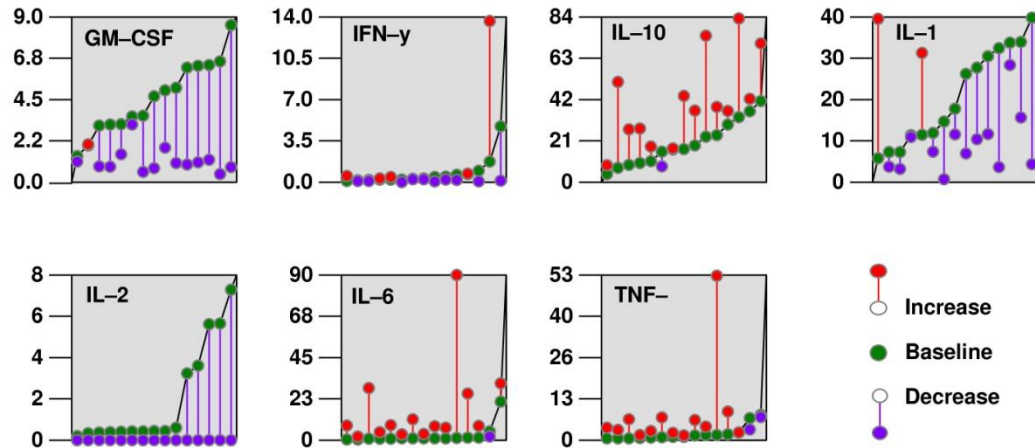
Gráfico de pizza que ilustra a proporção média das 7 citocinas nos indivíduos que completaram os 12 meses de acompanhamento. O gráfico inicial representa a composição de citocinas no GCF no início do estudo, enquanto os gráficos seguintes representam a concentração de citocinas GCF na visita de 6 e de 12 meses para os dois grupos clínicos. Os gráficos foram dimensionados de modo a refletir os níveis totais de citocinas. As diferenças dos dados entre o início e 6 ou 12 meses foi testada pelo Teste de Dunn: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . A diferença dos dados entre 6 e 12 meses estão representadas por †  $p < 0,05$ .

Figura 3 - Gráficos de fluido gengival crevicular média (GCF) e dos níveis de citocinas 6 meses pós-terapia.



Gráficos de fluido gengival crevicular média (GCF) e dos níveis de citocinas (pg / ml) no início do estudo e 6 meses pós-terapia em indivíduos com periodontite agressiva generalizada no grupos placebo (painéis brancos) e sistêmicos (antibióticos painéis cinzentos). Os círculos verdes representam os níveis basais do GCF (medido em até 14 sítios por indivíduo) e foram ordenados em cada gráfico por indivíduo com o menor valor GCF para o valor mais alto pré-terapia. Os círculos vermelhos e roxos representam a média do GCF para cada indivíduo no 6<sup>o</sup>. mês. Os círculos vermelhos indicam um aumento médio, enquanto os círculos roxos indicam uma diminuição média nos níveis de citocinas do GCF após a terapia.

Figura 4 - Gráficos de fluido gengival crevicular média (GCF) e dos níveis de citocinas (pg / ml) no início do estudo e 12 meses pós-terapia.



Gráficos de fluido gengival crevicular média (GCF) e dos níveis de citocinas (pg / ml) no início do estudo e 12 meses pós-terapia em indivíduos com periodontite agressiva generalizada . Os círculos verdes representam os níveis basais do GCF (medido em até 14 sítios por indivíduo) e foram ordenados em cada gráfico por indivíduo com o menor valor GCF para o valor mais alto pré-terapia. Os círculos vermelhos e roxos representam a média do GCF para cada indivíduo no 12<sup>o</sup>. mês. Os círculos vermelhos indicam um aumento médio, enquanto os círculos roxos indicam uma diminuição média nos níveis de citocinas do GCF após a terapia.

## ANEXOS

*J Clin Periodontol* 2012; 39: 295–302 doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01817.x

Journal of  
Clinical  
Periodontology

## Effects of periodontal therapy on GCF cytokines in generalized aggressive periodontitis subjects

Oliveira APL, Faveri M, Gursky LC, Mestnik MJ, Feres M, Haffajee AD, Socransky SS, Teles RP. Effects of periodontal therapy on GCF cytokines in generalized aggressive periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 2012; 39: 295–302. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01817.x.

### Abstract

**Aim:** To examine changes in levels of gingival crevicular fluid (GCF) cytokines, after periodontal therapy of generalized aggressive periodontitis (GAgP).

**Materials and Methods:** Twenty-five periodontally healthy and 24 GAgP subjects had periodontal clinical parameters measured and gingival crevicular fluid (GCF) samples collected from up to 14 sites/subject. GCF samples were analysed using multiplex bead immunoassay for: GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$ . Aggressive periodontitis subjects were randomly assigned to either scaling and root planing (SRP) alone or SRP plus systemic amoxicillin (500 mg) and metronidazole (400 mg) 3 times a day for 14 days. Clinical parameters and GCF cytokines were re-measured 6 months after treatment. Differences over time were analysed using the Wilcoxon test and between groups using the Mann-Whitney test.

**Results:** Significant reductions in GCF GM-CSF, IL-1 $\beta$  and the ratio IL-1 $\beta$ /IL-10 and increases in GCF IL-6 were detected after therapy. The mean change in GCF cytokines did not differ significantly between groups.

**Conclusions:** Periodontal therapy improved GCF cytokine profiles by lowering IL-1 $\beta$  and increasing IL-10 levels. The reduction in GCF GM-CSF after therapy implicates this cytokine in the pathogenesis of GAgP. There was no difference between therapies in changes of GCF cytokines.

Ana Paula de Lima Oliveira<sup>1</sup>, Marcelo de Faveri<sup>2</sup>, Lauren Christine Gursky<sup>3</sup>, Maria Josefa Mestnik<sup>2</sup>, Magda Feres<sup>2</sup>, Anne D. Haffajee<sup>4</sup>, Sigmund S. Socransky<sup>4</sup> and Ricardo Palmier Teles<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Periodontology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Periodontology, Dental Research Division, Guarulhos University, Guarulhos, SP, Brazil; <sup>3</sup>School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Parana, Curitiba, PR, Brazil; <sup>4</sup>The Forsyth Institute, Cambridge, MA, USA; <sup>5</sup>Department of Oral Medicine, Infection, and Immunity, Harvard School of Dental Medicine, Boston, MA, USA

Key words: cytokines; gingival crevicular fluid; periodontal disease; periodontal therapy

Accepted for publication 28 September 2011

Studies examining biomarkers in gingival crevicular fluid (GCF) have implicated several host-derived medi-

ators in the pathogenesis of periodontal diseases. These studies have focused on biomarkers with functions that fit our understanding of the pathological mechanisms involved in periodontal disease initiation and progression including pro-inflammatory cytokines, T helper 1 (Th1) cytokines and anti-inflammatory cytokines.

Pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) are released primarily by macrophages

after bacterial infection or tissue injury (Dinarello 1987). When released in high concentrations, these cytokines can stimulate the production and release of other inflammatory mediators such as IL-6, matrix metalloproteinases (MMPs) and prostaglandin E2 (PGE2) (Dinarello 2007). IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are also potent inducers of bone resorption and inhibitors of bone formation (Stashenko et al. 1987a,b). Several reports have indicated that GCF IL-1 $\beta$  is elevated in periodontitis

### Conflict of interest and source of funding

The authors declare that they have no conflict of interests.

This study was supported in part by NIDCR grant U01 DE021127 and by grant 2007/56413-0 from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil).

patients, when compared to healthy and gingivitis patients (Stashenko et al. 1991, Hou et al. 1995, Engebretson et al. 2002), is higher in active versus inactive sites (Reinhardt et al. 2010) and declines after periodontal treatment (Hou et al. 1995, Al-Shammari et al. 2001, Engebretson et al. 2002, Zhong et al. 2007, Rosalem et al. 2011). Furthermore, soluble antagonists to IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were capable of reducing loss of connective tissue attachment and alveolar bone in non-human primates (Delima et al. 2001).

Interleukin-6 is often secreted together with other pro-inflammatory cytokines during the induction of acute phase reactions. Early reports indicated that GCF levels of IL-6 were elevated during periodontal disease progression in chronic (Geivelis et al. 1993) and in refractory periodontitis (Lee et al. 1995). A recent randomized, placebo-controlled study on the impact of adjunctive subantimicrobial-dose doxycycline (SDD) demonstrated SDD was associated with a higher decrease in GCF IL-6 compared to the placebo group (Emingil et al. 2011). These findings suggest that IL-6 is involved in the inflammation-induced tissue destruction of the periodontium.

Interleukin-2 and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) are cytokines released by the Th1 subset of CD4 T-helper cells. Due to the potent pro-inflammatory properties of IFN- $\gamma$ , several authors have proposed a role for a Th1-type response during periodontal disease activity (Stashenko et al. 2007, Dutzan et al. 2009). In fact, IFN- $\gamma$  has been associated with progressing periodontal lesions of chronic periodontitis (Alpagot et al. 2003, Dutzan et al. 2009). Higher levels of GCF IL-2 have also been reported in active sites of refractory periodontitis subjects compared to non-progressing sites (Lee et al. 1995). However, studies on the effects of periodontal therapy on Th1 GCF cytokines have been inconclusive. A recent study has reported statistically significant reductions as a result of periodontal mechanical treatment in GCF IFN- $\gamma$  and IL-2 (Thunell et al. 2010) while another demonstrated a trend for an increase in GCF levels of IFN- $\gamma$  after periodontal therapy (Del Pelos-

o Ribeiro et al. 2008). In addition, Rosalem et al. 2011 could not detect any significant changes in GCF IFN- $\gamma$  in response to periodontal treatment.

Studies using IL-10 knockout mice have implicated this anti-inflammatory cytokine in the pathogenesis of periodontal diseases. Sasaki et al. 2004, 2008 demonstrated that these animals are highly susceptible to alveolar bone destruction induced by *Porphyromonas gingivalis* infection. This immunoregulatory cytokine can inhibit a series of pro-inflammatory signals and has also been involved in the suppression of MMPs and in the stimulation of osteoprotegerin (OPG), an inhibitor of bone resorption (Garlet 2010). Studies on GCF levels of IL-10 have also resulted in conflicting findings. Gamonal et al. 2000 reported a decrease in the total amounts of GCF IL-10 as a result of periodontal therapy, while Del Peloso Ribeiro et al. 2008 found a statistically significant increase in GCF IL-10 after mechanical debridement. Further, Goutoudi et al. 2004 could not find differences in the GCF levels of IL-10 between periodontally diseased and non-diseased sites and reported no changes as a result of treatment.

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is produced primarily by monocytes/macrophages, fibroblasts and endothelial cells and plays an essential role in normal neutrophil development. This cytokine has been shown to prolong the persistence of neutrophils in gingival tissues from chronic periodontitis subjects by reducing their apoptosis (Gamonal et al. 2003). However, the presence of GM-CSF in GCF has not been extensively studied and the only report that examined this inflammatory mediator in GCF samples from periodontitis subjects did not find differences between healthy and diseased sites (Thunell et al. 2010). In addition, the authors could not find a change in GCF GM-CSF levels as a consequence of mechanical periodontal therapy.

We have previously analysed clinical parameters, microbial data and levels of GCF cytokines in generalized aggressive periodontitis (GAgP) subjects (Teles et al. 2010). This cross-sectional study demonstrated

that GAgP subjects had statistically significantly higher GCF levels of IL-1 $\beta$ , GM-CSF and IL-1 $\beta$ /IL-10 ratio compared to periodontally healthy subjects. We concluded that GAgP subjects were characterized by a higher IL-1 $\beta$ /IL-10 ratio than periodontally healthy subjects, suggesting an imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines in aggressive periodontitis. The goal of the present study was to follow up the cross-sectional study by an intervention study that would determine if periodontal treatment would change the GCF cytokine profile in aggressive periodontitis to one more similar to that observed in periodontal health. Thus, changes in levels of GCF IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 and GM-CSF were assessed in GAgP subjects as a result of two forms of periodontal therapy.

## Materials and Methods

### Subject population and clinical monitoring

Twenty-five periodontally healthy and 30 GAgP subjects were recruited at the Guarulhos University periodontal clinic (Guarulhos, SP, Brazil). The Guarulhos University's Ethics Committee approved the study protocols including the periodontal examination and the taking of GCF samples. Each subject read and signed an informed consent form before entering the study. To be included in the study, the periodontally healthy subjects had to be  $\geq 18$  and  $< 30$  years of age, have at least 24 natural teeth and no probing pocket depth (PD) and clinical attachment level (CAL)  $> 3$  mm and have less than 20% of the sites with bleeding on probing (BOP). The GAgP subjects had to be  $\leq 30$  years of age, have at least 20 natural teeth and a minimum of six incisors and/or first molars with at least one site with PD and CAL  $\geq 5$  mm, as well as a minimum of six teeth other than first molars and incisors also presenting at least one site with PD and CAL  $\geq 5$  mm.

The diagnosis of GAgP was based on the criteria set forth by the American Academy of Periodontology (Armitage 1999) and required familial aggregation, that is, at least one other family member either pre-

senting or with a history of periodontal disease. Subjects were excluded if they had any systemic condition that would influence the course of periodontal disease and medical conditions that would require antibiotic prophylaxis for dental procedures. Individuals who smoked, had taken antibiotics in the previous 6 months, had received any previous subgingival therapy or were either pregnant or nursing were also excluded.

Bleeding on probing (0 or 1), PD (mm) and CAL (mm) were measured at six sites per tooth (mesiobuccal, buccal, distobuccal, mesiolingual, lingual and distolingual) for all teeth present (excluding third molars), for a maximum of 168 sites per subject, by a calibrated examiner (M. J. M.). PD and CAL were recorded to the nearest millimetre using a North Carolina periodontal probe (Hu-friedy, Chicago, IL, USA).

#### Experimental design

In this double-blinded, randomized clinical trial, GAgP subjects were randomly assigned to one of the following treatment groups: SRP + placebo or SRP + systemic antibiotics (SRP + MET and AMX). The antibiotic regimen prescribed was: metronidazole (MET) 400 mg and amoxicillin (AMX) 500 mg three times a day (t.i.d.) for 14 days. Subjects in the SRP group received two placebo capsules t.i.d. for 14 days. All subjects were instructed to rinse for 1 min. with 15 ml of 0.12% chlorhexidine (CHX) solution twice a day for 60 days. The antibiotic and placebo regimens and the chemical plaque control started immediately after the first session of mechanical instrumentation. Clinicians and study subjects were blinded to treatment assignment during the study. All GAgP subjects received full-mouth supragingival scaling, instruction in oral hygiene and full-mouth SRP performed under local anaesthesia in up to six appointments lasting approximately 1 h each. Mechanical therapy was completed within 14 days of the baseline visit and SRP was performed by a single trained periodontist using manual instruments (M. J. M.). Clinical monitoring for GAgP subjects was repeated 6 months post-therapy.

#### Gingival crevicular fluid sampling

Gingival crevicular fluid (GCF) samples were obtained from the mesio-buccal site of every tooth present (excluding third molars) in two randomly selected contra-lateral quadrants (up to 14 sites per subject). Following isolation of the site with cotton rolls, supragingival plaque was removed, the area air dried and a 30-s GCF sample collected with filter strips (Periopapers, Interstate Drug Exchange, Amityville, NY, USA). Periopaper strips were gently inserted into the orifice of the periodontal pocket, 1–2 mm subgingivally. Gingival crevicular fluid volume was determined using a Periotron 8000 (Oralcare Inc., Plainville, NY, USA), calibrated following the protocol described by (Chapple et al. 1999). Samples were immediately placed in Eppendorf tubes on ice, transported to the laboratory and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . GCF samples were collected before clinical measurements at baseline and 6 months after treatment. Samples visibly contaminated with blood were discarded. All GCF samples were shipped frozen to the Forsyth Institute, Cambridge, MA for analysis.

#### Quantification of cytokines using multiplexed bead immunoassay (Luminex)

Cytokine levels were determined using a high-sensitivity human cytokine 7-plex Millipore kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Before the assay, GCF samples were eluted using 60  $\mu\text{l}$  of the assay buffer provided in the Millipore kit by vortexing for 30 min. and then centrifuging for 10 min. at 11,200 *g*. Seven cytokines: GM-CSF, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were measured. The assays were performed in 96-well filter plates following the manufacturer's instructions (for details see Teles et al. 2010). Briefly, microsphere beads coated with monoclonal antibodies against the seven different target analytes were added to the wells of a filter plate. Samples and standards (ranging from 0.13 to 2000 pg/ml for each analyte) were added and incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . The wells were washed and a mixture of biotinylated secondary antibodies was added. After incubation, streptavidin conjugated to R-phycoerythrin was added

to the beads and incubated for 30 min. After washing, sheath fluid (Luminex, MiraiBio, Alameda, CA, USA) was added to the wells and the beads were analysed in the Luminex 100™ instrument. The concentrations of the antigens in GCF samples were estimated from the standard curve using a third-order polynomial equation and the GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) and expressed as pg/ml. Samples below the detection limit of the assay were recorded as zero, while samples above the upper limit of quantification of the standard curves were assigned the highest value of the curve.

#### Data analysis

Clinical data were obtained from six sites per tooth in each periodontally healthy subject at baseline and from GAgP individuals at baseline and 6 months after periodontal therapy. Mean values were calculated for each individual and averaged across subjects in each clinical group at baseline and for the two treatment groups at baseline and 6 months separately. The mean numbers and mean percentage of sites with PD  $> 4$  mm that bled on probing were also computed. Significance of changes in clinical data over time was determined using the Wilcoxon signed ranks test for each treatment group separately.

Gingival crevicular fluid levels of seven cytokines were measured in up to 14 sites per subject. The ratio between the levels of IL-1 $\beta$ /IL-10 was also calculated. The mean values for each cytokine parameter was then calculated for each subject and across subjects in each clinical group at each time point separately. Significance of changes over time in GCF biochemical parameters was determined using the Wilcoxon signed ranks test for each treatment group separately.

Clinical and cytokine baseline data were subtracted from the 6-month data to compute the changes resulting from therapy in each treatment group. Mean changes obtained by each therapy were compared using the Mann-Whitney test. Due to differences in mean PD and CAL between clinical groups,

ANCOVA adjusting for baseline PD and CAL was used to confirm the significance of statistical differences obtained for unadjusted values.

To examine changes in cytokines levels at periodontal sites that exhibited AL "gain" or no change compared with sites that exhibited an increase in the AL measurement, the cytokine values of each type were averaged within each subject and then averaged across subjects in each group separately. Significant differences in mean cytokine values between the sites that gained attachment or did not change compared to those that increase in attachment were tested using the Mann-Whitney test. Similar analyses were performed for sites subset into those that decreased in PD or did not change versus those that increased in PD.

## Results

### Subject retention

The study was conducted between July 2007 and September 2009. Out of the 30 GAgP subjects initially enrolled, GCF samples could be collected from 24 subjects at baseline and the 6-month follow-up visit: 12 in the control group (SRP + placebo) and 12 in the test group (SRP + MET and AMOX).

### Clinical findings

Table 1 presents the mean ( $\pm$ SD) demographic and clinical parameters

for the two treatment groups at baseline and at the 6 months and for the periodontally healthy (control) group at baseline. The demographic data illustrate that the three groups were balanced for age and gender distribution. However, treatment groups had statistically significantly different mean baseline PD and CAL. The Wilcoxon test indicated that reductions in mean PD, CAL, percentage of BOP and number of pockets > 4 mm that bled on probing were statistically significant in both treatment groups. When mean changes in clinical parameters were compared between treatment groups using the Mann-Whitney test, the antibiotics group had statistically significantly greater mean PD reduction and mean CAL gain compared to the placebo group (data not shown). Due to the differences in baseline mean PD and CAL the statistical significance of comparisons between changes in clinical parameters for the two treatment groups was tested using ANCOVA adjusting for baseline PD and CAL and the adjusted values for mean PD and CAL changes remained statistically significantly different (Table 1).

### Gingival crevicular fluid cytokine changes

A total of 895 GCF samples were processed as part of the study: For the samples collected from the periodontally healthy group, the frequency of detection for each of the

seven cytokines at baseline was: GM-CSF, 85%; IL-2, 83%; IFN- $\gamma$ , 63%; IL-10, 99%; IL-6, 94%; IL-1 $\beta$ , 99%; and TNF- $\alpha$ , 98%. Among GAgP subjects, the frequency of detection for each of the seven cytokines at baseline was: GM-CSF, 79%; IL-2, 79%; IFN- $\gamma$ , 69%; IL-10, 99%; IL-6, 94%; IL-1 $\beta$ , 100%; and TNF- $\alpha$ , 99%, while the frequencies of detection 6 months after therapy were: GM-CSF, 83%; IL-2, 0%; IFN- $\gamma$ , 43%; IL-10, 95%; IL-6, 92%; IL-1 $\beta$  96%; and TNF- $\alpha$ , 96%.

Gingival crevicular fluid levels of each cytokine at baseline and 6 months post-therapy in each site are highlighted in Fig. 1. There was considerable variability among individual sites in the treatment response. The effect of treatment on the mean GCF cytokine levels (pg/ml) of the entire study group (N = 24) can be seen in Table 2. Despite the high level of variability, significant reductions in the levels of GM-CSF and IL-1 $\beta$  and increases in levels of IL-6 after treatment could be detected. The ratio IL-1 $\beta$ /IL-10 also reduced significantly. The mean GCF levels of each cytokine for the control group are also presented as reference values. No statistical comparisons were conducted between the treatment groups and the control group.

Figure 2 presents the entire distribution of mean values of GCF cytokines for all subjects in each treatment group separately. A cer-

Table 1. Mean ( $\pm$ SD) demographic and clinical parameters at baseline and 6 months for the two treatment groups and for the control group

Parameter	SRP + placebo (n = 12)			SRP + MET and AMX (n = 12)			Control (n = 25)
	Baseline	6-month	Change <sup>1</sup>	Baseline	6-month	Change	
Age (years) %	26 $\pm$ 3			27 $\pm$ 3			26 $\pm$ 3
Males	33			50			45
PD (mm)	3.9 $\pm$ 0.5 <sup>†</sup>	2.9 $\pm$ 0.4 <sup>**†</sup>	-1.1 $\pm$ 0.3 <sup>§§</sup>	4.4 $\pm$ 0.6 <sup>†</sup>	2.5 $\pm$ 0.2 <sup>**†</sup>	-1.7 $\pm$ 0.3 <sup>§§</sup>	2.3 $\pm$ 0.5
CAL (mm)	4.0 $\pm$ 0.5 <sup>†</sup>	3.2 $\pm$ 0.6 <sup>**</sup>	-0.9 $\pm$ 0.4 <sup>§</sup>	4.7 $\pm$ 0.8 <sup>†</sup>	3.1 $\pm$ 0.5 <sup>**</sup>	1.3 $\pm$ 0.4 <sup>§</sup>	1.7 $\pm$ 0.4
% BOP	77 $\pm$ 18	17 $\pm$ 14 <sup>**</sup>	-62 $\pm$ 23	77 $\pm$ 18	10 $\pm$ 9 <sup>**</sup>	-64 $\pm$ 23	8 $\pm$ 9
NMT	2.3 $\pm$ 2.8	3.0 $\pm$ 4.0	0.8 $\pm$ 2.0	4.2 $\pm$ 4.0	4.3 $\pm$ 4.2	0.1 $\pm$ 2.0	0.5 $\pm$ 1.2
Pockets >4 mm BOP+ve (%)	51 $\pm$ 15 (33)	7 $\pm$ 9 (5) <sup>**</sup>	-47 $\pm$ 18 (-31)	60 $\pm$ 18 (42)	3 $\pm$ 5 (3) <sup>**</sup>	-53 $\pm$ 18 (-36)	0

\*\* $p$  < 0.01, compared to baseline using Wilcoxon signed ranks test.

<sup>†</sup> $p$  < 0.05 between therapy groups using Mann-Whitney.

<sup>§§</sup> $p$  < 0.001.

<sup>§</sup> $p$  < 0.05 between groups using ANCOVA adjusting for baseline PD and AL.

<sup>1</sup>Mean values  $\pm$ SD after ANCOVA adjustments.

AMX, amoxicillin; CAL, clinical attachment level; BOP, bleeding on probing; MET, metronidazole; NMT, number of missing teeth; PD, pocket depth; SRP, scaling and root planing.

ANCOVA adjusting for baseline PD and CAL was used to confirm the significance of statistical differences obtained for unadjusted values.

To examine changes in cytokines levels at periodontal sites that exhibited AL "gain" or no change compared with sites that exhibited an increase in the AL measurement, the cytokine values of each type were averaged within each subject and then averaged across subjects in each group separately. Significant differences in mean cytokine values between the sites that gained attachment or did not change compared to those that increase in attachment were tested using the Mann-Whitney test. Similar analyses were performed for sites subset into those that decreased in PD or did not change versus those that increased in PD.

## Results

### Subject retention

The study was conducted between July 2007 and September 2009. Out of the 30 GAgP subjects initially enrolled, GCF samples could be collected from 24 subjects at baseline and the 6-month follow-up visit: 12 in the control group (SRP + placebo) and 12 in the test group (SRP + MET and AMOX).

### Clinical findings

Table 1 presents the mean ( $\pm$ SD) demographic and clinical parameters

for the two treatment groups at baseline and at the 6 months and for the periodontally healthy (control) group at baseline. The demographic data illustrate that the three groups were balanced for age and gender distribution. However, treatment groups had statistically significantly different mean baseline PD and CAL. The Wilcoxon test indicated that reductions in mean PD, CAL, percentage of BOP and number of pockets > 4 mm that bled on probing were statistically significant in both treatment groups. When mean changes in clinical parameters were compared between treatment groups using the Mann-Whitney test, the antibiotics group had statistically significantly greater mean PD reduction and mean CAL gain compared to the placebo group (data not shown). Due to the differences in baseline mean PD and CAL the statistical significance of comparisons between changes in clinical parameters for the two treatment groups was tested using ANCOVA adjusting for baseline PD and CAL and the adjusted values for mean PD and CAL changes remained statistically significantly different (Table 1).

### Gingival crevicular fluid cytokine changes

A total of 895 GCF samples were processed as part of the study: For the samples collected from the periodontally healthy group, the frequency of detection for each of the

seven cytokines at baseline was: GM-CSF, 85%; IL-2, 83%; IFN- $\gamma$ , 63%; IL-10, 99%; IL-6, 94%; IL-1 $\beta$ , 99%; and TNF- $\alpha$ , 98%. Among GAgP subjects, the frequency of detection for each of the seven cytokines at baseline was: GM-CSF, 79%; IL-2, 79%; IFN- $\gamma$ , 69%; IL-10, 99%; IL-6, 94%; IL-1 $\beta$ , 100%; and TNF- $\alpha$ , 99%, while the frequencies of detection 6 months after therapy were: GM-CSF, 83%; IL-2, 0%; IFN- $\gamma$ , 43%; IL-10, 95%; IL-6, 92%; IL-1 $\beta$  96%; and TNF- $\alpha$ , 96%.

Gingival crevicular fluid levels of each cytokine at baseline and 6 months post-therapy in each site are highlighted in Fig. 1. There was considerable variability among individual sites in the treatment response. The effect of treatment on the mean GCF cytokine levels (pg/ml) of the entire study group (N = 24) can be seen in Table 2. Despite the high level of variability, significant reductions in the levels of GM-CSF and IL-1 $\beta$  and increases in levels of IL-6 after treatment could be detected. The ratio IL-1 $\beta$ /IL-10 also reduced significantly. The mean GCF levels of each cytokine for the control group are also presented as reference values. No statistical comparisons were conducted between the treatment groups and the control group.

Figure 2 presents the entire distribution of mean values of GCF cytokines for all subjects in each treatment group separately. A cer-

Table 1. Mean ( $\pm$ SD) demographic and clinical parameters at baseline and 6 months for the two treatment groups and for the control group

Parameter	SRP + placebo (n = 12)			SRP + MET and AMX (n = 12)			Control (n = 25)
	Baseline	6-month	Change <sup>1</sup>	Baseline	6-month	Change	
Age (years) %	26 $\pm$ 3			27 $\pm$ 3			26 $\pm$ 3
Males	33			50			45
PD (mm)	3.9 $\pm$ 0.5 <sup>†</sup>	2.9 $\pm$ 0.4** <sup>†</sup>	-1.1 $\pm$ 0.3 <sup>§§</sup>	4.4 $\pm$ 0.6 <sup>†</sup>	2.5 $\pm$ 0.2** <sup>†</sup>	-1.7 $\pm$ 0.3 <sup>§§</sup>	2.3 $\pm$ 0.5
CAL (mm)	4.0 $\pm$ 0.5 <sup>†</sup>	3.2 $\pm$ 0.6**	-0.9 $\pm$ 0.4 <sup>§</sup>	4.7 $\pm$ 0.8 <sup>†</sup>	3.1 $\pm$ 0.5**	1.3 $\pm$ 0.4 <sup>§</sup>	1.7 $\pm$ 0.4
% BOP	77 $\pm$ 18	17 $\pm$ 14**	-62 $\pm$ 23	77 $\pm$ 18	10 $\pm$ 9**	-64 $\pm$ 23	8 $\pm$ 9
NMT	2.3 $\pm$ 2.8	3.0 $\pm$ 4.0	0.8 $\pm$ 2.0	4.2 $\pm$ 4.0	4.3 $\pm$ 4.2	0.1 $\pm$ 2.0	0.5 $\pm$ 1.2
Pockets >4 mm BOP+ve (%)	51 $\pm$ 15 (33)	7 $\pm$ 9 (5)**	-47 $\pm$ 18 (-31)	60 $\pm$ 18 (42)	3 $\pm$ 5 (3)**	-53 $\pm$ 18 (-36)	0

\*\* $p$  < 0.01, compared to baseline using Wilcoxon signed ranks test.

<sup>†</sup> $p$  < 0.05 between therapy groups using Mann-Whitney.

<sup>§§</sup> $p$  < 0.001.

<sup>§</sup> $p$  < 0.05 between groups using ANCOVA adjusting for baseline PD and AL.

<sup>1</sup>Mean values  $\pm$ SD after ANCOVA adjustments.

AMX, amoxicillin; CAL, clinical attachment level; BOP, bleeding on probing; MET, metronidazole; NMT, number of missing teeth; PD, pocket depth; SRP, scaling and root planing.

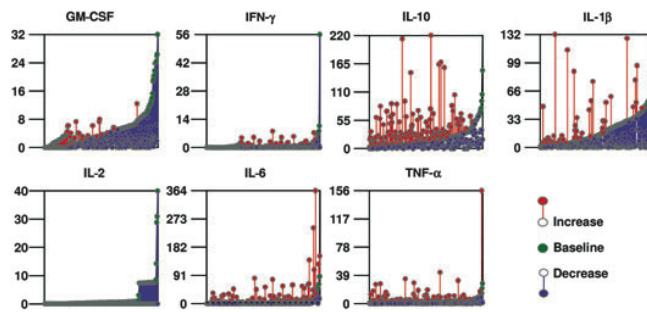


Fig. 1. Plots of gingival crevicular fluid (GCF) cytokine levels (pg/ml) for each site sampled in the generalized aggressive periodontitis subjects at baseline and 6 months post-therapy. The green circles represent the baseline GCF levels and have been ordered in each panel from the site with the lowest GCF value to the highest value pre-therapy. The red and purple circles represent the 6 month GCF levels for each site. The red circles indicate increase, whereas the purple circles indicate a decrease after treatment in the site levels of GCF cytokines.

Table 2. Mean ( $\pm$ SD) GCF cytokine levels (pg/ml) for the generalized aggressive periodontitis subject at baseline and 6 months after therapy and for the control subjects

GCF parameter	Generalized aggressive periodontitis ( $n = 24$ )		Control ( $n = 25$ )
	Baseline	6-month	
GM-CSF (pg/ml)	4.2 $\pm$ 2.3	1.6 $\pm$ 1.0***	2.2 $\pm$ 1.2
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	0.7 $\pm$ 1.1	0.4 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 1.2
IL-10 (pg/ml)	18.0 $\pm$ 9.0	22.6 $\pm$ 19.0	23.7 $\pm$ 19.9
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	<b>19.3 <math>\pm</math> 10.0</b>	<b>9.0 <math>\pm</math> 13.9**</b>	7.0 $\pm$ 3.9
IL-2 (pg/ml)	<b>1.8 <math>\pm</math> 2.4</b>	<b>0.0 <math>\pm</math> 0.0**</b>	0.7 $\pm$ 1.2
IL-6 (pg/ml)	3.2 $\pm$ 5.7	9.3 $\pm$ 16.0*	1.9 $\pm$ 3.9
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	1.9 $\pm$ 1.8	3.5 $\pm$ 4.3	1.9 $\pm$ 1.4
IL-1 $\beta$ /IL-10	<b>2.5 <math>\pm</math> 2.0</b>	<b>0.6 <math>\pm</math> 0.6***</b>	0.5 $\pm$ 0.4

\* $p < 0.05$ .

\*\* $p < 0.01$ .

\*\*\* $p < 0.001$  compared to baseline using Wilcoxon signed ranks test.

GCF, gingival crevicular fluid; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; IL, interleukin; TNF, tumour necrosis factor.

Bold face indicates statistically significant differences from baseline to 6 months.

tain degree of variability is still present, but it is apparent that most subjects in both groups presented decreases in mean GCF levels of GM-CSF, IL-2 and IL-1 $\beta$ . Table 3 presents the mean GCF cytokine levels (pg/ml) for the two treatment groups at baseline and at the 6-month follow-up visit. There were no statistically significant differences between treatment groups. There were significant reductions in the levels of GM-CSF and the ratio IL-1 $\beta$ /IL-10 in both treatment groups. In addition, in the group receiving AM there was a statistically significant decrease in mean levels of IL-1 $\beta$ . When the mean changes in levels of GCF cytokines from baseline to

6 months were compared between treatment groups using Mann-Whitney, differences were not statistically significant (data not shown).

#### Site level changes

When sites were subset into those that exhibited no change or "gain" in AL and compared with those that exhibited an increase in AL, there was a significant difference in mean GM-CSF values between groups. Sites that improved or did not change had a mean decrease of 2.76  $\pm$  2.46 pg/ml versus 0.24  $\pm$  2.76 pg/ml ( $p < 0.01$ ). The ratio IL-1 $\beta$ /IL-10 also decreased more in the sites that did not change or improved than in the sites that

increased in AL (mean  $\pm$  SD) 1.95  $\pm$  2.05 compared to 0.55  $\pm$  2.26 respectively ( $p < 0.01$ ). Similar significantly different changes in mean GM-CSF and IL-1 $\beta$ /IL-10 ratio were observed for sites that increased or decreased in PD (data not shown).

#### Discussion

The data presented here were obtained during a clinical trial originally designed and powered to compare SRP alone and SRP with adjunctive systemic antibiotics. The primary outcome variable was the effect of each therapy on the mean proportions of red complex species. The 3-month clinical and microbiological outcomes of the study have already been reported (Mestnik et al. 2010) and the 6-month follow-up data will be reported elsewhere (manuscript in preparation). In the present study, GCF cytokine levels were examined as secondary outcome variables using exploratory data analysis techniques. As a first approach, we examined whether periodontal therapy, irrespective of the type, would result in changes in GCF cytokines. We then determined whether differences in efficacy could be observed between the two therapies employed. The goal was to further test our original observations of differences in GCF cytokine profiles between periodontal health and disease based on cross-sectional data by examining longitudinally the impact of therapy on GCF cytokines associated with GAAP. Due to the exploratory nature of the analysis adjustments for multiple comparisons were not included.

The clinical outcome of the randomized clinical trial provided additional evidence of a beneficial adjunctive clinical effect of the combination of amoxicillin and metronidazole when associated with mechanical debridement. The systemic antibiotic therapy not only resulted in greater mean pocket deep reduction and mean clinical attachment level gain, comparable to previously reported data (Guerrero et al. 2005, Cionca et al. 2009), but was also associated with a low mean number of residual deep pockets that bled on probing.

Our previous cross-sectional study suggested that generalized

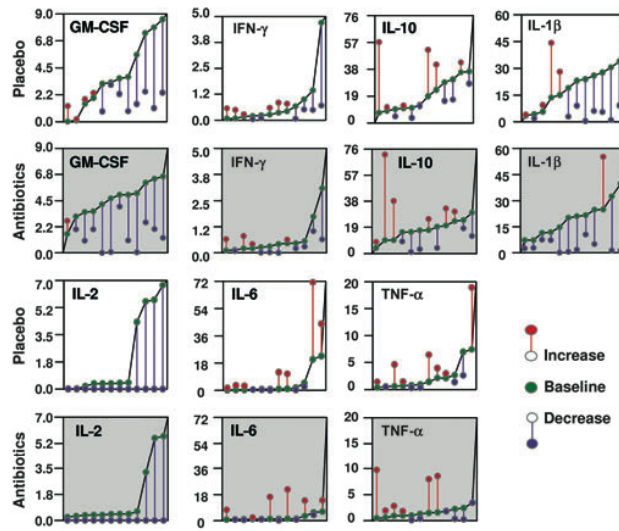


Fig. 2. Plots of mean gingival crevicular fluid (GCF) cytokine levels (pg/ml) at baseline and 6 months post-therapy in generalized aggressive periodontitis subjects in the placebo (white panels) and systemic antibiotic (grey panels) groups. The green circles represent the mean baseline GCF levels (measured at up to 14 sites per subject) and have been ordered in each panel from the subject with the lowest GCF value to the highest value pre-therapy. The red and purple circles represent the 6 month mean GCF data for each subject. The red circles indicate a mean increase, while the purple circles indicate a mean decrease in GCF cytokine levels after treatment.

Table 3. Mean ( $\pm$ SD) GCF cytokine levels (pg/ml) for the two clinical groups at baseline and 6 months after therapy

GCF parameter	SRP + placebo ( $n = 12$ )		SRP+ MET and AMX ( $n = 12$ )	
	Baseline	6-month	Baseline	6-month
GM-CSF (pg/ml)	3.9 $\pm$ 2.9	1.7 $\pm$ 0.9*	4.6 $\pm$ 1.5	1.6 $\pm$ 1.2**
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	0.8 $\pm$ 1.3	0.5 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.9	0.4 $\pm$ 0.4
IL-10 (pg/ml)	19.2 $\pm$ 10.9	24.4 $\pm$ 18.6	16.9 $\pm$ 7.0	20.9 $\pm$ 20.0
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	18.8 $\pm$ 10.4	10.1 $\pm$ 13.0	19.7 $\pm$ 9.9	7.9 $\pm$ 15.2*
IL-2 (pg/ml)	2.0 $\pm$ 2.7	0.0 $\pm$ 0.0**	1.5 $\pm$ 2.1	0.0 $\pm$ 0.0**
IL-6 (pg/ml)	4.4 $\pm$ 7.8	12.1 $\pm$ 21.6	2.0 $\pm$ 1.9	6.6 $\pm$ 7.4
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	2.2 $\pm$ 2.4	3.7 $\pm$ 5.2	1.5 $\pm$ 0.9	3.3 $\pm$ 3.5
IL-1 $\beta$ /IL-10	2.4 $\pm$ 1.6	0.6 $\pm$ 0.7**	2.6 $\pm$ 2.4	0.6 $\pm$ 0.6**

\* $p < 0.05$ .

\*\* $p < 0.01$ , compared to baseline using Wilcoxon signed ranks test.

AMX, amoxicillin; GCF, gingival crevicular fluid; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; IL, interleukin; MET, metronidazole; TNF, tumour necrosis factor; SRP, scaling and root planing.

Bold face indicates statistically significant differences from baseline to 6 months.

aggressive periodontitis was associated with higher GCF levels of IL-1 $\beta$ , GM-CFS and the IL-1 $\beta$ /IL-10 ratio than those found in a periodontally healthy subject group (Teles et al. 2010). Our current findings extend these observations by

demonstrating that periodontal therapy significantly decreased GCF levels of GM-CFS, IL-1 $\beta$  and the IL-1 $\beta$ /IL-10 ratio. The data presented in Table 2 indicate that the levels of GCF cytokines obtained after therapy closely resembled the values for

the periodontally healthy control group. In addition, the comparisons between sites that remained stable or improved to sites that "lost" clinical attachment after treatment confirmed the association between decreases in GCF GM-CSF and IL-1 $\beta$ /IL-10 ratio with clinical improvements.

Interleukin-1 $\beta$  has been extensively studied in GCF. In accord with our current data multiple studies demonstrated a decrease in GCF levels of IL-1 $\beta$  after treatment (Engebretson et al. 2002, Zhong et al. 2007, Rosalem et al. 2011). Goutoudi et al. 2004, demonstrated a decrease in total amounts of GCF IL-1 $\beta$  while IL-10 levels remained stable up to 32 weeks after surgical periodontal treatment. They concluded that periodontitis was associated with an inverse relationship between IL-1 $\beta$  and IL-10. A recent paper showed that periodontal treatment of generalized aggressive periodontitis patients resulted in statistically significant reductions in GCF IL-1 $\beta$  while IL-10 was unaltered (Toker et al. 2008). Our data are in agreement with these reports inasmuch we also could not find a statistically significant change in levels of IL-10 as a result of therapy. In contrast, Gamonal et al. 2000 reported a decrease in levels of GCF IL-10 as a result of scaling and root planing. Our results suggest that periodontal treatment partially reversed the perceived imbalance between the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  and the anti-inflammatory IL-10.

GM-CSF has not been extensively studied in GCF but a recent report indicated no difference in the GCF levels of this cytokine between healthy and diseased sites and no change in GCF GM-CSF content as a consequence of mechanical periodontal therapy (Thunell et al. 2010). However, the study differed considerably from ours in that: 1) the study population involved 6 subjects with generalized severe chronic periodontitis; 2) they were followed for 6–8 weeks after initial periodontal therapy; and 3) the multiplex bead immunoassay employed had a much lower sensitivity with a lower limit of detection of 15.6 pg/ml compared to 0.13 pg/ml in our study.

Some of our findings were not in agreement with the current understanding of the role of IL-6 in periodontitis. This pro-inflammatory cytokine has been associated with periodontal tissue destruction and IL-6 has been proposed as a biomarker of periodontal disease progression (Geivels et al. 1993). We anticipated that therapy would result in reductions in their GCF levels, as recently reported by (Emingil et al. 2004). However, there is evidence that IL-6 might also act as a potent anti-inflammatory cytokine. In a murine model of periapical lesion, IL-6 knockouts and the neutralization of IL-6 using antibodies resulted in significantly higher periapical bone resorption (Balto et al. 2001).

An alternative explanation for the increase in GCF levels of IL-6 after therapy resides in the fact that GCF content might not fully reflect the levels of certain biomarkers within the inflamed periodontal tissues. Guillot et al. 1995 reported that IL-6 levels were elevated in gingival connective tissue adjacent to intra-bony pockets which did not respond to mechanical therapy. However, IL-6 levels in GCF were significantly greater at sites that responded to therapy than at sites that did not. They suggested that IL-6 was localized to the inflamed tissues, resulting in a reduced rate of release into GCF.

We could not find an effect of the periodontal therapy on GCF levels of IFN- $\gamma$ . Similar findings have been recently published (Rosalem et al. 2011) but conflicting data have also been reported (Del Peloso Ribeiro et al. 2008, Thunell et al. 2010). The low frequency of detection for this analyte might indicate that it is present in very low amounts in GCF. Although the significant reduction in GCF levels of IL-2 fit our understanding of its role in periodontal diseases, the low frequency of detection and our failure to detect GCF IL-2 after therapy suggest that this finding should be interpreted with caution.

Early reports indicated that the systemic use of antibiotics during periodontal treatment of subjects with "rapidly progressive periodontitis" resulted in changes in the enzyme profile of GCF that were associated with clinical improve-

ments (Atici et al. 1998). However, recent reports on the effects of adjunctive antibiotics in the treatment of periodontitis could not demonstrate an additional impact on GCF biomarkers when compared to mechanical therapy alone (Mascarenhas et al. 2005, Giannopoulou et al. 2006, Machtei & Younis 2008). Comparisons between these reports and our data are hindered by methodological difference such as time of follow up, antibiotic type and/or regimen employed, inclusion of smokers, and GCF biomarkers assessed.

A recent article suggested that the use of azithromycin could reduce the GCF levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF- $\alpha$  in periodontally healthy subjects (Ho et al. 2010). The authors concluded that this effect was a result of the anti-inflammatory properties of azithromycin. To our knowledge, neither metronidazole nor amoxicillin have anti-inflammatory effects. Therefore, the changes in GCF cytokines associated with the adjunctive use of antibiotics reported here should be interpreted as an indirect result of the antimicrobial effects of these drugs. In our previous report on the 3-month clinical and microbial outcomes of this trial, we demonstrated that the adjunctive use of systemic metronidazole and amoxicillin was associated with a greater reduction in the proportions of red and orange complex species, compared to the placebo group (Mestnik et al. 2010). The 6-month microbiological data confirm these preliminary findings (data not shown).

We could not demonstrate any statistically significant difference in the effect of the two different therapies on GCF cytokine content. However, we must emphasize that this study was not originally designed to detect difference between the clinical groups regarding the effects of the two therapies on GCF cytokine levels. Therefore, our findings should be interpreted with this limitation in mind.

In summary, our results provided additional support to the notion that GAgP is accompanied by a local imbalance in the levels of the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  and the anti-inflammatory cytokine IL-10. The data indicated that periodontal

therapy partially reversed the ratio IL-1 $\beta$ /IL-10 to levels found in periodontal health. Comparisons between the two therapies could not demonstrate significant differences. Finally, the reduction in GCF levels of GM-CSF as a result of periodontal therapy indicates that this cytokine may play a role in the pathogenesis of GAgP.

#### Acknowledgements

The authors would like to express their appreciation to Dr. Jose Eustaquio da Costa and Dr. Fernando de Oliveira Costa at the School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil for their support during the preparation of this manuscript.

#### References

- Alpagot, T., Font, K. & Lee, A. (2003) Longitudinal evaluation of GCF IFN-gamma levels and periodontal status in HIV+ patients. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 944–948.
- Al-Shammari, K. F., Giannobile, W. V., Aldredge, W. A., Iacono, V. J., Eber, R. M., Wang, H. L. & Oringer, R. J. (2001) Effect of non-surgical periodontal therapy on C-terminal pyridinoline cross-links (CTP) and interleukin-1 levels. *Journal of Periodontology* **72**, 1045–1051.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* **4**, 1–6.
- Atici, K., Yamalik, N., Eratalay, K. & Etikan, I. (1998) Analysis of gingival crevicular fluid intracytoplasmic enzyme activity in patients with adult periodontitis and rapidly progressive periodontitis. A longitudinal study model with periodontal treatment. *Journal of Periodontology* **69**, 1155–1163.
- Balto, K., Sasaki, H. & Stashenko, P. (2001) Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. *Infection and Immunity* **69**, 744–750.
- Chapple, I. L., Garner, I., Saxby, M. S., Moscrop, H. & Matthews, J. B. (1999) Prediction and diagnosis of attachment loss by enhanced chemiluminescent assay of crevicular fluid alkaline phosphatase levels. *Journal of Clinical Periodontology* **26**, 190–198.
- Cionca, N., Giannopoulou, C., Ugolotti, G. & Mombelli, A. (2009) Amoxicillin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **80**, 364–371.
- Del Peloso Ribeiro, E., Bittencourt, S., Sallum, E. A., Nociti, F. H. Jr, Goncalves, R. B. & Casati, M. Z. (2008) Periodontal debridement as a therapeutic approach for severe chronic periodontitis: a clinical, microbiological and immunological study. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 789–798.
- Delima, A. J., Oates, T., Assuma, R., Schwartz, Z., Cochran, D., Amar, S. & Graves, D. T. (2001) Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibitors

- loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 233–240.
- Dinarello, C. A. (1987) The biology of interleukin 1 and comparison to tumor necrosis factor. *Immunology Letters* **16**, 227–231.
- Dinarello, C. A. (2007) Historical insights into cytokines. *European Journal of Immunology* **37** (Suppl. 1), S34–S45.
- Dutzan, N., Vernal, R., Hernandez, M., Dezerega, A., Rivera, O., Silva, N., Aguilon, J. C., Puente, J., Pozo, P. & Gamonal, J. (2009) Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **80**, 290–296.
- Emingil, G., Atilla, G., Sorsa, T., Luoto, H., Kirilmaz, L. & Baylas, H. (2004) The effect of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **75**, 106–115.
- Emingil, G., Gurkan, A., Atilla, G. & Kantarci, A. (2011) Subantimicrobial-dose doxycycline and cytokine-chemokine levels in gingival crevicular fluid. *Journal of Periodontology* **82**, 452–461.
- Engelbreton, S. P., Grbic, J. T., Singer, R. & Lamster, I. B. (2002) GCF IL-1 $\beta$  profiles in periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 48–53.
- Gamonal, J., Acevedo, A., Bascones, A., Jorge, O. & Silva, A. (2000) 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. *Journal of Periodontology* **71**, 1535–1545.
- Gamonal, J., Sanz, M., O'Connor, A., Acevedo, A., Suarez, I., Sanz, A., Martinez, B. & Silva, A. (2003) Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 616–623.
- Garlet, G. P. (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research* **89**, 1349–1363.
- Gevelis, M., Turner, D. W., Pederson, E. D. & Lamberts, B. L. (1993) Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *Journal of Periodontology* **64**, 980–983.
- Giannopoulou, C., Andersen, E., Brochut, P., Plagnat, D. & Mombelli, A. (2006) Enamel matrix derivative and systemic antibiotics as adjuncts to non-surgical periodontal treatment: biological response. *Journal of Periodontology* **77**, 707–713.
- Goutoudi, P., Diza, E. & Arvanitidou, M. (2004) Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 $\beta$  and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *Journal of Dentistry* **32**, 511–520.
- Guerrero, A., Griffiths, G. S., Nibali, L., Suvan, J., Moles, D. R., Laurell, L. & Tonetti, M. S. (2005) Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 1096–1107.
- Guillot, J. L., Pollock, S. M. & Johnson, R. B. (1995) Gingival interleukin-6 concentration following phase I therapy. *Journal of Periodontology* **66**, 667–672.
- Ho, W., Eubank, T., Leblebicioglu, B., Marsh, C. & Walters, J. (2010) Azithromycin decreases crevicular fluid volume and mediator content. *Journal of Dental Research* **89**, 831–835.
- Hou, L. T., Liu, C. M. & Rossomando, E. F. (1995) Crevicular interleukin-1 $\beta$  in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. *Journal of Clinical Periodontology* **22**, 162–167.
- Lee, H. J., Kang, I. K., Chung, C. P. & Choi, S. M. (1995) The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **22**, 885–890.
- Machtei, E. E. & Younis, M. N. (2008) The use of 2 antibiotic regimens in aggressive periodontitis: comparison of changes in clinical parameters and gingival crevicular fluid biomarkers. *Quintessence International* **39**, 811–819.
- Mascarenhas, P., Gapski, R., Al-Shammari, K., Hill, R., Soehren, S., Fenno, J. C., Giannobile, W. V. & Wang, H. L. (2005) Clinical response of azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in smokers. *Journal of Periodontology* **76**, 426–436.
- Mestnik, M. J., Feres, M., Figueiredo, L. C., Duarte, P. M., Lira, E. A. & Faveri, M. (2010) Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 353–365.
- Reinhardt, R. A., Stoner, J. A., Golub, L. M., Lee, H. M., Nummikoski, P. V., Sorsa, T. & Payne, J. B. (2010) Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **81**, 251–259.
- Rosalem, W., Rescala, B., Teles, R. P., Fischer, R. G., Gustafsson, A. & Figueiredo, C. (2011) Effect of non-surgical treatment on chronic and aggressive periodontitis: clinical, immunological and microbiological findings. *Journal of Periodontology* **82**, 979–989.
- Sasaki, H., Okamoto, Y., Kawai, T., Kent, R., Taubman, M. & Stashenko, P. (2004) The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss. *Journal of Periodontal Research* **39**, 432–441.
- Sasaki, H., Suzuki, N., Kent, R., Jr, Kawashima, N., Takeda, J. & Stashenko, P. (2008) T cell response mediated by myeloid cell-derived IL-12 is responsible for Porphyromonas gingivalis-induced periodontitis in IL-10-deficient mice. *Journal of Immunology* **180**, 6193–6198.
- Stashenko, P., Dewhirst, F. E., Peros, W. J., Kent, R. L. & Ago, J. M. (1987a) Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *Journal of Immunology* **138**, 1464–1468.
- Stashenko, P., Dewhirst, F. E., Rooney, M. L., Desjardins, L. A. & Heeley, J. D. (1987b) Interleukin-1 $\beta$  is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research* **2**, 559–565.
- Stashenko, P., Fujiyoshi, P., Obermesser, M. S., Prostak, L., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1991) Levels of interleukin 1 $\beta$  in tissue from sites of active periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **18**, 548–554.
- Stashenko, P., Goncalves, R. B., Lipkin, B., Ficarelli, A., Sasaki, H. & Campos-Neto, A. (2007) Th1 immune response promotes severe bone resorption caused by Porphyromonas gingivalis. *American Journal of Pathology* **170**, 203–213.
- Teles, R. P., Gursky, L. C., Faveri, M., Rosa, E. A., Teles, F. R., Feres, M., Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2010) Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 313–323.
- Thunell, D. H., Tynkiw, K. D., Johnson, G. K., Joly, S., Burnell, K. K., Cavanaugh, J. E., Brogden, K. A. & Guthmiller, J. M. (2010) A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. *Journal of Periodontal Research* **45**, 148–152.
- Toker, H., Poyraz, O. & Eren, K. (2008) Effect of periodontal treatment on IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 507–513.
- Zhong, Y., Slade, G. D., Beck, J. D. & Offenbacher, S. (2007) Gingival crevicular fluid interleukin-1 $\beta$ , prostaglandin E2 and periodontal status in a community population. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 285–293.

Address:  
R. P. Teles  
Department of Periodontology  
The Forsyth Institute, 245 First Street  
Cambridge, MA 02142, USA.  
E-mail: rteles@forsyth.org

#### Clinical Relevance

**Scientific rationale for the study:** Differences between cytokine profiles have been described between GCF samples taken from periodontal health and aggressive periodontitis. This investigation determined whether an intervention

(periodontal therapy) diminished these differences. **Principal findings:** Periodontal therapy changed the cytokine profile of aggressive periodontitis GCF samples to one more similar to periodontal health. GCF GM-CSF also decreased after therapy, implicating this cyto-

kine in the pathogenesis of GAgP. The two therapies did not differ in their effects on GCF cytokines. **Practical implications:** Better definition of the GCF cytokine profiles in GAgP could lead to biomarkers that would improve the diagnosis and monitoring of this condition.