

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
PERIODONTIA

Linha de Pesquisa

Epidemiologia, Etiopatogenia e Repercussão das
Doenças da Cavidade Bucal e Estruturas Anexas

Dissertação

**CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE BIOMARCADORES
INFLAMATÓRIOS POR UM NOVO DISPOSITIVO DE
COLETA DE FLUIDO CREVICULAR GENGIVAL –
ESTUDO PILOTO**

Aluna: Keity Taminski

Orientadora: Sabrina Carvalho Gomes

Porto Alegre

2015

KEITY TAMINSKI

**CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS
POR UM NOVO DISPOSITIVO DE COLETA DE FLUIDO CREVICULAR
GENGIVAL – ESTUDO PILOTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Nível Mestrado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica - Periodontia.

Orientadora: Sabrina Carvalho Gomes

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Taminski, Keity
CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE BIOMARCADORES
INFLAMATÓRIOS POR UM NOVO DISPOSITIVO DE COLETA DE
FLUIDO CREVICULAR GENGIVAL - ESTUDO PILOTO / Keity
Taminski. -- 2015.
35 f.

Orientadora: Sabrina Carvalho Gomes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. fluido crevicular gengival. 2. validação
estudo. 3. doença periodontal. 4. citocinas. I.
Carvalho Gomes, Sabrina, orient. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Augustino Taminski e Neiva Fink Taminski, e ao meu noivo, Bruno Bianchini D'Avila, que sempre me apoiaram e me incentivaram.

Muito obrigada! Amo vocês!

Agradecimentos:

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, pela força e coragem de não desistir dos meus sonhos.

Aos meus pais Neiva e Augustino que a vida toda batalharam para me dar estudo. Pelo incentivo, amor, carinho e apoio que recebi nesse período. Obrigada por estarem sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis. O ano que passou não foi fácil para nós, mas vencemos todos juntos essa batalha. Vocês são grandes exemplos de força e determinação. Amo vocês, obrigada!

Ao meu noivo e futuro marido, Bruno D'Avila, te agradeço por estar sempre me apoiando, me incentivando e me ajudando. És um excelente companheiro, amigo, estudioso e dedicado a nossa profissão. Meu amor, obrigada por tornar meus dias mais alegres. Te amo muito!

Um agradecimento especial a Prof^a Dr^a Sabrina Carvalho Gomes pelos ensinamentos, dedicação e a paciência comigo. És uma pessoa especial, amiga e com um dom incrível para ser professora, suas aulas são inspiradoras. Obrigada de coração!

Aos demais professores da periodontia, que tive oportunidade de conhecer, conviver e aprender nesses 2 anos de caminhada. Descobri que além de professores são amigos e conselheiros. Obrigada!

A instituição de ensino UFRGS por possibilitar o desenvolvimento de pesquisas, e por acolher os seu alunos. Ao laboratório de genética da UFRGS, pela realização das análises do presente estudo.

Um agradecimento especial, aos meus professores de Santa Maria-RS, Carlos Heitor Cunha Moreira e a professora Karla Kantorski, pelo apoio e incentivo para seguir meus estudos na área de periodontia.

As companheiras da pesquisa, Amanda, Pati, Jú, Marina e Karin, um beijo especial a vocês que durante este tempo convivemos, ouvimos conselhos umas das outras, e formamos uma equipe especial.

A outra equipe, a do Trailer, não podia deixar de citar aqui, foi muito especial e produtivo além da grande amizade que construímos. Fazia chuva ou sol, todos sempre animados para “onde vamos hoje?” “Qual o próximo setor?”. Experiências e novos caminhos foram descobertos, além de amizades, comidas e sabores diferentes a cada dia. Obrigada pessoal sem vocês não seria a mesma coisa. Um beijo - Fernanda, Marina, Ricardo (Leny), Tassi e Wilker.

Um agradecimento especial a Amanda que me ajudou diretamente no desenvolvimento do trabalho, parceira desde a coleta do material, tempo de análise no laboratório, e desenvolvimento do artigo. Pati obrigada pela ajuda e pelas considerações que fez durante o desenvolvimento do trabalho. Beijinhos!

Aos colegas de pós graduação agradeço a amizade que vai ficar para sempre. Os bons e maus momentos que passamos juntos serão lembrados com muito amor e carinho.

Agradeço a toda minha família, pela compreensão que muitas vezes faltei a eventos familiares por estar tão distante de vocês. Ao meu afilhado querido, que está hoje, com 3 aninhos, espero no próximo aniversário estar presente, a dinda te ama! Espero recuperar um pouco esse tempo!

Agradeço ao meu cunhado, Felipe D'Avila, pelo companheirismo, e por dividir apartamento comigo e com o meu noivo durante esse tempo. Agradeço as conversas, risadas e a nossa amizade que cresceu e fortaleceu com essa convivência. Pode contar comigo quando precisar.

Um agradecimento especial aos meus sogros Elizete e Luiz Renato, que deste o tempo de faculdade me acolheram com muito amor e carinho, já que residiam na mesma cidade onde eu e meu noivo fazíamos faculdade. São pessoas muito especiais, que admiro muito! Obrigada por tudo que vocês tem feito por mim e pelo Bruno! Obrigada pelo apoio e incentivo! Agradeço ao meu cunhado Diogo, e sua namorada Carol pela amizade e carinho, vocês são muito especiais!

Agradeço as minhas amigas da faculdade, pela amizade que segue cada vez mais forte, que mesmo distante, estamos sempre nos apoiando. Amo vocês amigas..Ana Maria,, Binha, Ju, Laura, Luana, Rafa e Thaís!

Obrigada a todos que de alguma forma colaboraram para o dia de hoje, um beijo especial a todos! Estou muito feliz!

Att, Keity Taminski

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA E JUSTIFICATIVA.....	9
3. OBJETIVOS:	15
4. ARTIGO.....	16
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS:	33
6. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

Frente ao caráter relevante e primordial do eixo imune/inflamatório no desenvolvimento da doença periodontal, este tem sido crescentemente investigado. Soma-se a isto a maior disponibilidade de métodos e meios para este tipo de investigação. O Fluido Crevicular Gengival (FCG), por representar um exsudato inflamatório importante, é investigado não só em relação ao seu fluxo, representado pelo volume presente no sulco/bolsa, mas, também, em relação aos seus componentes. As citocinas presentes no FCG são importantes indicadores de reposta local e sistêmica e, portanto, são constantemente investigadas. Por isto, o método e o meio de coleta de FCG são essenciais para que uma análise adequada, tanto das condições presentes, quanto da possibilidade de que venham ocorrer, possa ser realizada.

A coleta do FCG por meio de tiras de papel absorvente é um método não invasivo e amplamente utilizado. O dispositivo que pode ser considerado referência, pois tem um uso ampliado neste tipo de investigação, o Periopaper®, é fabricado nos Estados Unidos da América e, por isto, depende de importação, gerando um elevado custo para o desenvolvimento de pesquisas no Brasil. Este custo é, por vezes, impeditivo, ou no mínimo limitador, para a realização de pesquisas clínicas. Foi esta razão que motivou Alencar e Gomes (2009) e Alencar et al. (2011) a avaliar um novo dispositivo de coleta de FCG. Naquele estudo eles observaram que o dispositivo testado tem alto grau de reprodutibilidade no que se refere à capacidade de absorção volumétrica de FCG absorvido quando comparado ao dispositivo referência (Periopaper®). No entanto, como aquele não foi testado em relação à sua capacidade de retenção de marcadores inflamatórios, questões

importantes relacionadas ao processo saúde/doença periodontal ficaram sem resposta. O presente estudo, portanto, dá continuidade ao processo de validação do dispositivo teste visando à compreensão de até qual extensão, sob o ponto de vista clínico, ele pode ser utilizado.

2. REVISÃO DE LITERATURA E JUSTIFICATIVA

O biofilme depositado sobre os dentes, sem ser removido por um período de tempo, leva ao desenvolvimento da gengivite. Esta observação, realizada inicialmente em 1965 (1), está amparada por estudos mais recentes (2-4), que identificam manifestações clínicas (i.e. sangramento gengival) a partir de dias (7 a 21) de acúmulo do biofilme dental supragengival. Por outro lado, por meio de uma modelo diferenciado de gengivite experimental, Weidlich et al. (2001), mostraram que uma zona livre de placa, presente entre o bordo cervical do biofilme dental e a margem gengival, deixa de existir quando, por 96 horas, é permitido o acúmulo daquele. Os autores sugerem que este “desaparecimento” da Zona Livre de Placa se dá em decorrência do edema gengival, ainda não perceptível clinicamente. Desta forma, alterações na formação e composição do biofilme supragengival, invariavelmente, são acompanhadas por alterações de cunho inflamatório da gengiva marginal (5).

A compreensão da natureza infecto-inflamatória das doenças periodontais é de fundamental importância quando se pretende entender o processo etiopatogênico destas doenças, destrutivas ou não. Em outras palavras, será o potencial de reposta imune/inflamatória que cada hospedeiro pode exercer em relação à presença do biofilme supragengival e, também, à do biofilme subgengival, fundamental para que as alterações nos tecidos periodontais se limitem ao periodonto de proteção ou se estendam ao periodonto de inserção (6, 7).

Independentemente de ser um processo inflamatório marginal ou que se estenda ao periodonto de inserção, o fato da doença periodontal ter o cunho infecto-inflamatório

direciona a investigação, em pesquisas de etiopatogenia, para dois vetores: o microbiológico e o inflamatório/imunológico.

As pesquisas que envolvem a análise microbiológica identificam uma infinidade de bactérias relacionadas ao processo saúde-doença periodontal (8-10). É contemporâneo o conceito de biofilme e, portanto, de que as bactérias que participam deste processo sejam componentes natos da microbiota bucal humana (8, 9, 11). Por outro lado, decorre, desta compreensão, o conceito da infecção periodontal como uma infecção oportunista (12): o aumento quantitativo e as alterações qualitativas expressas em um biofilme dependem das condições de respiração e nutrição estabelecidas neste microambiente que por sua vez, depende, da resposta imune/inflamatória. Desta forma, biofilme e hospedeiro têm uma relação de retroalimentação.

Este eixo imune-inflamatório, quando investigado localmente, o é, majoritariamente, por meio de avaliações de volume do fluido crevicular gengival (FCG) ou da sua composição. O FCG é um exsudato inflamatório liberado constantemente, mesmo na ausência de manifestações clinicamente visíveis de inflamação do tecido periodontal (13, 14). Isto porque este é sempre desafiado por microrganismos bucais e, por conseguinte, sempre mantém uma reposta de defesa. À medida que o “desafio” microbiológico aumenta, aumenta, também, a reposta imune/inflamatória (9, 15, 16).

O aumento do volume de fluido crevicular gengival (FCG) é uma defesa do organismo que tem por objetivo lavar e remover bactérias e seus produtos, impedindo, assim, o avanço dos microrganismos ao ambiente subgengival (15). Porém, o organismo não consegue combater o biofilme dental apenas fisicamente. Portanto, não somente o volume, mas também a sua composição, são alterados ao longo do tempo frente à presença

de um biofilme dental estabelecido (5, 13, 17). Toda essa resposta imune/inflamatória do indivíduo tem a função de “combater” o ataque desses microrganismos e, assim, impedir o estabelecimento e/ou a progressão da doença periodontal.

De acordo com Brill e Krasse (1958) o interesse pelo fluido crevicular gengival (FCG) iniciou no final dos anos 1950. Estes demonstraram que um papel de filtro, colocado no sulco gengival em modelos animais, podia detectar um corante injetado na corrente sanguínea (18). Desde então, muitos estudos surgiram e, dentre estes, tanto avaliações transversais da relação biofilme/hospedeiro, quanto visando buscar indicadores preditivos de doença periodontal destrutiva (19). Sendo o FCG uma expressão da condição do processo saúde-doença periodontal, sua coleta é importante para o estudo do desenvolvimento desse processo (15, 20-22). O fato do FCG representar tão bem as mudanças inflamatórias, mesmo as subclínicas, fez com que métodos de coleta como micropipetas, aparelhos de sucção e tiras de filtro de papel (que são colocadas no interior do sulco ou bolsa) para absorção do FCG fossem estudados ao longo dos anos (15, 19).

Estudos mostram que há um aumento no volume do FCG quando há inflamação nos tecidos, e conseqüentemente alteração na quantidade de citocinas presente nesse fluido (19, 21, 23, 24). O volume de FCG e a concentração de citocinas depende da inflamação local (13). Por exemplo, Teles et al. (2010) avaliaram 20 pacientes saudáveis e 20 pacientes com periodontite crônica. O objetivo do estudo foi comparar, entre os grupos, a quantidade de biomarcadores inflamatórios (IL-1 β , IL-8 e MMP-8), microbiota subgengival e indicadores clínicos. Os autores constataram diferença significativa entre o volume de FCG coletado entre os grupos. Da mesma forma, observaram que os sítios doentes apresentaram, significativamente, maiores concentrações de IL-1 β e IL-8. Associação positiva entre as

bactérias do complexo vermelho (*T. denticola*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*) entre os indicadores clínicos (PS, porcentagem de sítios com SS e placa visível) com estas citocinas também é relatada (24).

Com o objetivo de analisar a relação da perda de inserção futura com as citocinas presentes no FCG um estudo realizado por Silva et al. (2008) avaliou 18 pacientes com periodontite crônica moderada ou avançada. Neste estudo, foram realizados os exames periodontais: profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC), índice de placa visível (IPV) e sangramento à sondagem (SS) em seis sítios por dente. A coleta de FCG foi realizada com tiras de papel absorvente Periopaper® (ProFlow, Amityville, NY, USA) em sítios “ativos” (aumento de, no mínimo, 2mm de perda de inserção) e “inativos” (manutenção ou redução dos dados observados no Dia 0). Os exames foram realizados nos dias 0 e 7 e no mês 2 e as comparações foram entre os sítios “ativos” e “inativos”. Observou-se que não houve diferença entre os volumes coletados nos sítios “inativos” ou “ativos”, mas que os sítios “ativos” apresentaram maiores concentrações de algumas das citocinas avaliadas (RANK-L, IL-1 β) (25). Em um outro estudo que acompanhou pacientes em manutenção periódica durante dois anos, com visitas a cada 6 meses, observou-se que o aumento de IL-1 β e MMP-8 durante o primeiro ano de manutenção periodontal foi associado a maiores chances de perda de inserção futura (OR:1.67, OR:1.50 respectivamente) em 2 anos de acompanhamento. Os autores concluíram que elevadas concentrações de citocinas têm potencial para identificar pacientes que são vulneráveis à progressão de perda de inserção (26). Estes resultados são corroborados pelos achados de Kinney et al. (2014) que observaram que MMP-8, MMP-9, osteoprotegerina e IL-1 β apresentaram níveis mais altos nos sítios com progressão de doença periodontal do que em

sítios estáveis nos 6 meses de acompanhamento. Os autores concluíram que quando esses dados são interpretados juntamente com os dados clínicos tem-se melhor acuidade para se acompanhar a atividade da doença, o que poderia contribuir para estabelecer um prognóstico e tratamento ao paciente (27). Subentende-se, assim, que a investigação por meio do FCG tem duas vertentes importantes: é importante avaliar o volume e, ao mesmo tempo, avaliar sua constituição. Sendo assim, os métodos e meios de coleta são fundamentais às pesquisas.

Para que as avaliações de volume e constituição de FCG, diferentes métodos e meios para coleta do FCG estão descritos. O método de coleta de FCG mais utilizado é o de absorção (20, 23), quando tiras ou cones de papel são inseridos no sulco ou bolsa e, após alguns segundos, são removidos. O cálculo do volume pode ser feito por medição linear (28) ou por meio do Periotrom (29). Este último faz parte do sistema Periopaper® (Oraflow, New York, EUA). Este dispositivo, aqui considerado referência, entretanto, é de difícil importação, muitas vezes dificultando, ou até mesmo inviabilizando, estudos no Brasil. Alencar e Gomes (2009) e Alencar et al. (2011) mostraram que um dispositivo alternativo (AD) fabricado com papel absorvente é capaz de medir o volume de GCF (GCFV) recolhidos com um elevado grau de reprodutibilidade quando comparado com o dispositivo referência (30, 31).

Na literatura são encontrados trabalhos que relatam a quantidade de citocinas retidas em diferentes tiras de papel absorvente. Como no estudo de Johnson et al. (1999) que avaliaram *in vitro*, utilizando quantidade de proteínas pré determinadas, quatro tiras de papel absorvente diferentes: Whatman (W1, Whatman Inc. Clifton, NJ. USA), Whatman 3MM (W3, Whatman Inc. Clifton, NJ, USA), Periopaper ProFlow (P, ProFlow

Incorporated, Amityville, NY, USA), e Periopaper Harco (H, Harco Electronics, Ltd, Winnipeg, MB, Canadá). Foi observado que todas as tiras de papel retêm proteínas, sendo que os dispositivos W1, P e H retêm concentração mais altas, muito embora diferentes. Os autores discutem que a concentração de proteínas e diferenças no tipo de papel podem estar associadas às diferenças observadas (32).

Giannopoulou et al. (2003) avaliaram o nível de IL-1 β , IL-4, IL-6 IL-8 do FCG através da coleta com tiras de papel absorvente, (Durapore, Millipore Corp, Bedford, MA, USA), em indivíduos saudáveis, com gengivite e com periodontite. Foram coletados FCG de 4 sítios por paciente, com um total de 20 indivíduos em cada grupo. Eles observaram que os grupos de gengivite e periodontite apresentaram maior quantidade de IL-1 β , IL-6 e IL-8 do que nos sítios saudáveis (33).

Com base nos estudos citados acima, é possível verificar a importância e a necessidade de mais estudos sobre o processo saúde-doença periodontal, com o intuito de estabelecer diagnóstico em estágios iniciais da doença e progressão da perda de inserção em sítios com reativação da doença o mais cedo possível. Com o objetivo de facilitar mais pesquisas no Brasil, é necessário o desenvolvimento de um método de coleta que não seja tão custoso e que viabilize esses estudos. Esta foi a motivação expressa nos objetivos de Alencar (2009) e Alencar et al., (2011) (30, 31). No entanto, o dispositivo alternativo testado não foi, até o momento, avaliado em relação à sua capacidade de absorção. Desta forma, o presente estudo tem, por objetivo, comparar a capacidade de retenção de citocinas do FCG pelo dispositivo teste (30) à capacidade de retenção pelo dispositivo referência, o Periopaper®.

3. OBJETIVOS:

Comparar a capacidade de retenção de citocinas inflamatórias presentes no FCG utilizando-se um dispositivo teste e comparando-o ao dispositivo referência Periopaper® (OraFlow, PlainView, New York).

4. ARTIGO

Conforme normas exigidas pela revista *Brazilian Dental Journal*

Capacity of Gingival Crevicular Fluid cytokines retention by two absorbent papers

Running title: Capacity of cytokines retention

Keity Taminski¹, Amanda Finger Stadler¹, Priscila Vianna², José Artur Bogo Chies²,
Sabrina Carvalho Gomes¹.

1 – Section of Periodontology, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

2 – Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, Porto Alegre, RS, Brazil

Author of correspondence:

Sabrina Carvalho Gomes

Rua Ramiro Barcelos, 2492, Bairro Rio Branco

CEP 90035-003

Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: sabrinagomes.perio@gmail.com

Phone/Fax: +55-51-3308-5318

Capacity of Gingival Crevicular Fluid cytokines retention by two absorbent papers

Capacity of cytokines retention

ABSTRACT

The gingival crevicular fluid (GCF), a transudate in gingival health, becomes an inflammatory exudate with the increase of inflammation. Differences in the exudate volume and in the presence of enzymes, squamous cells, cell debris and inflammatory markers such as cytokines are dependent on inflammation status. Absorbent paper strips inserted into the sulcus/periodontal pocket are the most common GCF collection method. However, the standard device (PerioPaper®) is costly, making it difficult to carry out studies in Brazil. In this sense, the aim of this study is to compare the retention of cytokines between a test device as compared to the reference (PerioPaper®). GCF sampling, from 17 subjects (68 sites), was carried using both paper strips in 2 sites with gingivitis and 2 with periodontitis. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF- α concentrations were determined by flow cytometry. Data analysis was performed using SPSS 20.0 for Mac, with non-parametric tests. Concentration of IL-1 β , IL-6 and IL-8 were different inter-groups, the device concentration being greater. Two (IL-1 β and IL-6) and 4 (IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α) cytokines, respectively for Gingivitis and Periodontitis sites, were in higher concentrations in the test group. The results herein indicate the test device as clinically applicable and with the potential to replace the PerioPaper®

Key-Words: periodontal diseases, cytokines, validation studies, gingival crevicular fluid

INTRODUCTION

Periodontal diseases are characterized as infectious and inflammatory diseases that result from the interaction between the biofilm and the host response. Inflammatory and immune responses function is to combat the attack of microorganisms and thereby prevent the disease progression. These bacteria are required for the onset of the disease (1), but the degree of destruction of the supporting tissues depends on the host response, which in turn, may also have systemic and environmental influences (2, 3)

The gingival crevicular fluid (GCF) is an inflammatory exudate containing enzymes, squamous cells, cellular debris and biomarkers, as for example, cytokines. The measurement of GCF expresses the condition of periodontal health-disease process, and so the collection and analysis of this fluid is important to better comprehend this process (1, 4-6). The literature has shown that subjects with periodontal disease have increased levels of pro-inflammatory cytokines, and the levels reduce after periodontal treatment (7-9).

The amount of GCF and cytokines depends on the local inflammation (10). There are some methods used to collect GCF, as absorption with different devices and aspiration with micropipetes. The most common method for GCF collection is through absorption by placing absorbent paper strips in the sulcus or periodontal pocket (4, 10). The reference device (RD: PerioPaper®; Oraflow, Nova Iorque, EUA), however, is costly to import, hindering studies in Brazil. Alencar (2009) and Alencar et al. (2011), showed that a test device (TD) fabricated with absorbent paper is able to measure the GCF volume (GCFV) collected with a high degree of reproducibility when compared to the reference (11, 12). As a continuity of this validation process, the objective of this study is to evaluate whether this test device collection has the ability to retain the same inflammatory cytokines than the standard method.

MATERIAL AND METHODS

Study design and sample

This is a pilot study, designed as a cross-sectional clinical study. The Ethics Committee of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil, approved the protocol. All subjects signed the consent form before participate in the study. The sample comprised of 17 subjects that seek periodontal treatment at School of Dentistry, UFRGS, between may and july of 2014.

Inclusion Criteria

Subjects selected had more than 35 years, at least 12 teeth, diagnosis of gingivitis and chronic periodontitis (13) and no systemic disease that could interfere with the periodontal condition (i.e., diabetes). After inclusion, the sites selected for collection were as followed:

- 2 sites with periodontal pocket depth (PPD) and clinical attachment loss (CAL) < 3mm, positive gingival bleeding (GB) and with no bleeding on probing (BOP) – gingivitis sites
- 2 sites with PPD and CAL \geq 3mm, and positive GB and BOP – periodontitis sites.

GCF collection

Two trained examiners (KT, AFS) performed the GCF collection from 4 selected sites in 17 subjects, totaling 68 samples. Before collection, supragingival plaque was removed and the site was washed, gently dried and isolated with cotton rolls. One reference device (RD) paper strip (PerioPaper®, Oraflow, Nova Iorque, EUA) and one test device (TD) paper strip were inserted in the periodontal sulcus/pocket 1-2mm subgingivally, simultaneously, for 30 seconds. In the first site to be collected, the RD was positioned to the root surface and the TD was positioned to the epithelial sulcus surface. For the second site, the position of the strips was inverted. The same procedure was performed for gingivitis and periodontitis sites. Paper strips with visible blood were discarded and the collection was repeated after 1 minute. The GCF volume was immediately measured using a calibrated instrument (Periotrom 8000, Oraflow Inc., Plainview, NY, USA). Measurements were registered in Periotrom Units and converted to microliters (μ l) with a constituted standard curve. The samples were immediately placed in Eppendorf tubes containing 50 μ l of a

protease inhibitor cocktail (complete mini EDTA-free, protease inhibitor cocktail tablets; Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) and stored at -80 degrees Celsius (°C). The samples from each subject were pooled in 4 Eppendorfs as followed:

- 1 Eppendorf with 2 reference devices from gingivitis sites;
- 1 Eppendorf with 2 reference devices from periodontitis sites;
- 1 Eppendorf with 2 test devices from gingivitis sites;
- 1 Eppendorf with 2 test devices from periodontitis sites.

Biomarker analysis

Cytokine concentrations were determined by flow cytometer (BD FACSAria® III, BD Biosciences, San Diego, CA), with the proper software (BD Software CBA FACScalibur, BD Biosciences, San Diego, CA). The samples were unfrozen gradually and the cytokines were eluted from the strips by adding 150µl of phosphate buffered saline (PBS) and incubating in a shaker for 12 hours at 4°C. Aliquots of 50µl of each sample were used for analysis of the 6 cytokines Interleukin (IL) 1 beta (1β), IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and Tumor Factor Necrosis alpha (TNF-α) using a cytometric bead array kit (BD™ Cytometric Bead Array - Human Inflammatory Cytokines, BD Biosciences, San Diego, CA), under manufacturer instructions. Briefly, GCF samples were incubated with cytokine capture beads and a reporter molecule (PE) conjugated to detection antibodies for 3 hours at room temperature, protected from the light. After washing, cytokine concentrations were assessed using the flow cytometer.

Statistical analysis

Data analysis was performed using SPSS 20.0 for Mac (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Macintosh, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.). The data were tested for normality by the Kolmogorov-Smirnov test. GCFV and clinical indicators showed normal distribution and parametric tests were applied for inter-group comparison. Cytokines concentrations (Pg/ml) showed non-normal distribution. Means (\pm standard deviation) and median (with minimum and maximum values) were, then, generated. Bland

Altman dispersion graphs were used to test the agreement between the devices used to collect GCF.

RESULTS

Data from all 17 subjects (52.94% female, 52.94% smokers, mean age 52.29 ± 6.08) were included in the analysis. The mean PPD of gingivitis and periodontitis sites were 1.85 ± 0.56 and 4.41 ± 1.5 respectively (T-Test, $p=0.000$). The mean CAL were 1.09 ± 0.90 and 5.85 ± 1.69 for gingivitis and periodontitis sites respectively (T-test, $p=0.000$).

Table 1 shows the levels of GCF biomarkers according to the disease group and sampling device. Wilcoxon test was used, in gingivitis sites, statistical difference was observed in two cytokines: IL-1 β and IL-6. In periodontitis sites differences were observed for IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α . In all cases, the higher levels were observed for collections performed with test device. The inter-group volume of GCFV was compared by means of the T test for paired samples and showed statistical differences.

The Bland Altman dispersion graph showed agreement among the methods used in relation to IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF - α at gingivitis sites (Figure 1). At the periodontitis sites, the concordance of methods relayed on IL-6, IL-10 e IL-12p70 concentrations (figure 2).

DISCUSSION

The results of this pilot study shows that the test device was able to retain important cytokines related to periodontal health-disease imbalance as compared with a reference device (PerioPaper®, Oraflow, New York, EUA). Actually, the test device was able to retain higher levels of some cytokines. Therefore, it is possible to suggest that the test device can be used as an alternative to application in clinical investigations.

The tested device in this study was previously evaluated regarding its capacity of absorbing GCF. It was observed that this capacity was similar to that observed with PerioPaper® (11, 12). The present investigation adds information to the potential of this test device, once the capacity of retaining cytokines could be not only observed, but also it

showed to be higher for 4 out of 6 cytokines investigated when compared to PerioPaper®. For the remaining 2 cytokines, the levels were comparable between the two devices. Conversely, when the sites are divided into gingivitis and periodontitis, the results showed that there was difference in the levels collected with both devices for 2 cytokines in gingivitis sites, and difference in the levels of 4 out of 6 cytokines in periodontitis sites.

Comparisons between different devices capacity of protein retention has been evaluated before. Gustafsson (1996) compared the capacity of PerioPaper® and Durapore, using a predetermined concentration of proteins and observed that both devices were able to (14). Johnson et al. (1999) evaluated *in vitro*, also using a predetermined quantity of proteins, the capacity of retention of four devices: Whatman (W1; Whatman Inc. Clifton, NJ. USA), Whatman 3MM (W3; Whatman Inc. Clifton, NJ. USA), PerioPaper ProFlow (P; ProFlow Incorporated, Amityville, NY, USA) and PerioPaper Harco (H; Harco Electronics, Ltd, Winnipeg, MB, Canadá). It was observed that all devices retained proteins, but in different concentrations. The authors suggested that the results were due to differences between the papers (15). Differences in protein absorption between devices were also observed in the present study. Most probably it is also due to differences in the paper, as the GCF collection was performed simultaneously with both devices, in the same site.

Six important cytokines were investigated in the present investigation, four of them considered pro-inflammatory (IL-1 β , IL-6, IL-12p70 and TNF- α), one chemokine (IL-8) and one anti-inflammatory cytokine (IL-10). These cytokines were selected because the classical literature has shown that the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α are strongly related to periodontal disease (16, 17). Additionally, one important chemokine and one anti-inflammatory cytokine were also included. Even though commonly investigated, these cytokines do not encompass all the inflammatory markers commonly related to the periodontal pathogenesis (18). However, it is well understood and accepted that, as it is almost impossible that a sole investigation holds all the entire range of cytokines, some cytokines are important markers of periodontal condition along time (16, 19). In this scenario, it is important not only select a method for collection of the crevicular fluid and the cytokines to be evaluated, but also to guarantee its usage overtime in the same investigation.

The concentrations of IL-1 β and IL-6 are higher in periodontitis sites, as compared to gingivitis sites. These results are in accordance with the literature, showing that pro-inflammatory cytokines concentrations are dependent upon the inflammatory status or upon the presence or absence of disease. Giannoupoulou et al. (2003) assessed the GCF concentration of cytokines in subjects with gingivitis or periodontitis and observed that both cytokines were in higher concentrations in patients with periodontitis. This same study, however, also showed significant differences in IL-8 levels in subjects with periodontitis as compared with gingivitis (20). Likewise, Teles et al. (2010) observed increased IL-1 β and IL-8 in periodontitis patients when compared to healthy individuals (21). In contrast, the results of this investigation did not show significant differences in IL-8 levels between gingivitis and periodontitis sites.

In the present study was possible to observe agreement between the two collection devices. However, at gingivitis and periodontitis sites, respectively, IL-1 β and IL-6, and IL-1 β , IL-8 e TNF- α did not present agreement between collection devices. This assumption is based on the fact that the dispersion was not homogeneous and also by the fact that there were significant differences between the concentrations of these cytokines. Interestingly, the volume of crevicular fluid, even been statistically different, as shown by the inter-group comparison, presented agreement as shown by the Bland Altman analyses. This graph showed similar dispersion results. The results presented here are in accordance with Alencar and Gomes (2009) that did not show differences in volume measurements when comparing the two devices used herein.

In conclusion, the results of this pilot study indicate that the test device can be an alternative for GCF collection.

Resumo

O fluido crevicular gengival (FCG) é um exsudato presente na saúde gengival, que torna-se um exsudato inflamatório com o aumento da inflamação. Diferenças no volume do exsudato e a presença de enzimas, células escamosas, restos celulares e marcadores inflamatórios como as citocinas são dependentes do status inflamatório. Tiras de papeis

absorventes inseridas no sulco/bolsa periodontal são o método de coleta mais comum de FCG. Contudo, o dispositivo padrão é custoso, o que torna difícil a realização de estudos no Brasil. Nesse sentido, o objetivo deste estudo é comparar a retenção de citocinas entre o dispositivo teste e o de referência (PerioPaper®). Amostras de FCG, de 17 sujeitos (68 sítios), foram coletadas usando ambas tiras de papel em dois sítios com gengivite e 2 com periodontite. Concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF- α foram determinadas por citometria de fluxo. Análise dos dados foram medidas usando SPSS20.0 para MAC®, com testes não paramétricos. Houve diferenças estatísticas nos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8 coletados com ambos os dispositivos. Sítios de gengivite demonstraram diferenças significativas somente para duas citocinas (IL-1 β , IL-6), enquanto sítios de periodontite tiveram diferenças significativas para 4 citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α). Em todos os casos que demonstraram diferenças estatísticas, o dispositivo teste teve maior quantidade de citocinas retidas. Os resultados indicam que o dispositivo teste tem aplicabilidade clínica e tem potencial para substituir o PerioPaper®.

References

1. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology*. 2008;79(8 Suppl):1585-91.
2. Oppermann RV, Haas AN, Rosing CK, Susin C. Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America. *Periodontology 2000*. 2015;67(1):13-33.
3. Preshaw PM. Host response modulation in periodontics. *Periodontology 2000*. 2008;48:92-110.
4. Goodson JM. Gingival crevice fluid flow. *Periodontology 2000*. 2003;31:43-54.
5. Armitage GC. Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontology 2000*. 2004;34:109-19.
6. Lamster IB. Evaluation of components of gingival crevicular fluid as diagnostic tests. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. 1997;2(1):123-37.
7. Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, et al. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *Journal of clinical periodontology*. 2008;35(3):206-14.
8. Reinhardt RA, Stoner JA, Golub LM, Lee HM, Nummikoski PV, Sorsa T, et al. Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis. *Journal of periodontology*. 2010;81(2):251-9.
9. Kinney JS, Morelli T, Oh M, Braun TM, Ramseier CA, Sugai JV, et al. Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression. *Journal of clinical periodontology*. 2014;41(2):113-20.
10. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*. 2003;31:32-42.
11. Alencar FG, Kronbauer GC, Gomes SC. Validation of an alternative device for volumetric quantification of crevicular fluid. *Acta odontologica latinoamericana : AOL*. 2011;24(1):29-34.
12. Alencar FG, Gomes SC. Validation of an alternative absorbent paper for collecting gingival crevicular fluid. *R Periodontia*. 2009;19:85-90.
13. Page RC, Eke PI. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *Journal of periodontology*. 2007;78(7 Suppl):1387-99.
14. Gustafsson A. Methodological considerations in GCF sampling with paper strips: poor recovery of uncomplexed elastase. *Journal of clinical periodontology*. 1996;23(5):432-6.
15. Johnson RB, Streckfus CF, Dai X, Tucci MA. Protein recovery from several paper types used to collect gingival crevicular fluid. *Journal of periodontal research*. 1999;34(6):283-9.
16. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2014;64(1):57-80.
17. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*. 1997;14:9-11.
18. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontology 2000*. 2010;52(1):163-206.

19. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research*. 2010;89(12):1349-63.
20. Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *Journal of clinical periodontology*. 2003;30(2):145-53.
21. Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *Journal of periodontology*. 2010;81(1):89-98.

Table 1. Gingival Crevicular Fluid biomarkers concentration and volume (GCFV) for the reference (Periopaper®) and test devices according to periodontal inflammatory status (gingivitis or periodontitis)

	Gingivitis sites			Periodontitis sites		
	Reference Device	Test Device	p-value	Reference Device	Test Device	p-value
	Mean \pm SD (median; 25% - 75% percentiles)	Mean \pm SD (median; 25% - 75% percentiles)		Mean \pm SD (median; 25% - 75% percentiles)	Mean \pm SD (median; 25% - 75% percentiles)	
IL-1 β	4.35 \pm 1.82 (3.60; 3.09 – 5.03)	7.23 \pm 5.85 (5.03; 3.54 – 8.02)	0.035*	11.26 \pm 16.41 (6.29; 3.39 – 10.16)	24.86 \pm 29.84 (12.27; 4.07 – 35.57)	0.035*
IL-6	2.17 \pm 0.13 (2.18; 2.08 – 2.22)	2.56 \pm 0.95 (2.20; 2.15 – 2.58)	0.035*	2.53 \pm 0.83 (2.23; 2.18 – 2.54)	3.21 \pm 1.71 (2.33; 2.20 – 3.80)	0.001*
IL-8	15.63 \pm 32.56 (3.09; 2.65 – 11.79)	33.84 \pm 59.25 (3.94; 2.56 – 25.04)	0.093*	9.69 \pm 9.65 (6.64; 3.04 – 12.94)	41.30 \pm 39.75 (33.23; 6.02 – 57.93)	0.003*
IL-10	1.98 \pm 0.06 (1.98; 1.95 – 2.02)	1.98 \pm 0.08 (1.96; 1.94 – 2.02)	0.706*	1.97 \pm 0.04 (1.96; 1.94 – 2.00)	1.98 \pm 0.07 (1.98; 1.94 – 2.02)	0.456*
IL-12p70	1.94 \pm 0.08 (1.92; 1.86 – 2.01)	1.92 \pm 0.06 (1.92; 1.88 – 1.97)	0.617*	1.93 \pm 0.07 (1.92; 1.88 – 1.97)	1.94 \pm 0.07 (1.92; 1.92 – 1.99)	0.752*
TNF- α	2.44 \pm 0.05 (2.42; 2.42 – 2.44)	2.42 \pm 0.07 (2.42; 2.38 – 2.44)	0.267*	2.40 \pm 0.05 (2.39; 2.39 – 2.42)	2.45 \pm 0.07 (2.42; 2.42 – 2.53)	0.012*
GCFV (ul)	0.26 \pm 0.32 (0.14; 0.06 – 0.28)	0.42 \pm 0.34 (0.33; 0.14 – 0.52)	0.049#	0.49 \pm 0.39 (0.37; 0.26 – 0.56)	0.75 \pm 0.50 (0.67; 0.41 – 0.86)	<0.001#

* Wilcoxon signed-rank test, #Paired T-test.

Figure 1: Bland Altman plots for gingivitis sites according with the cytokine evaluated.

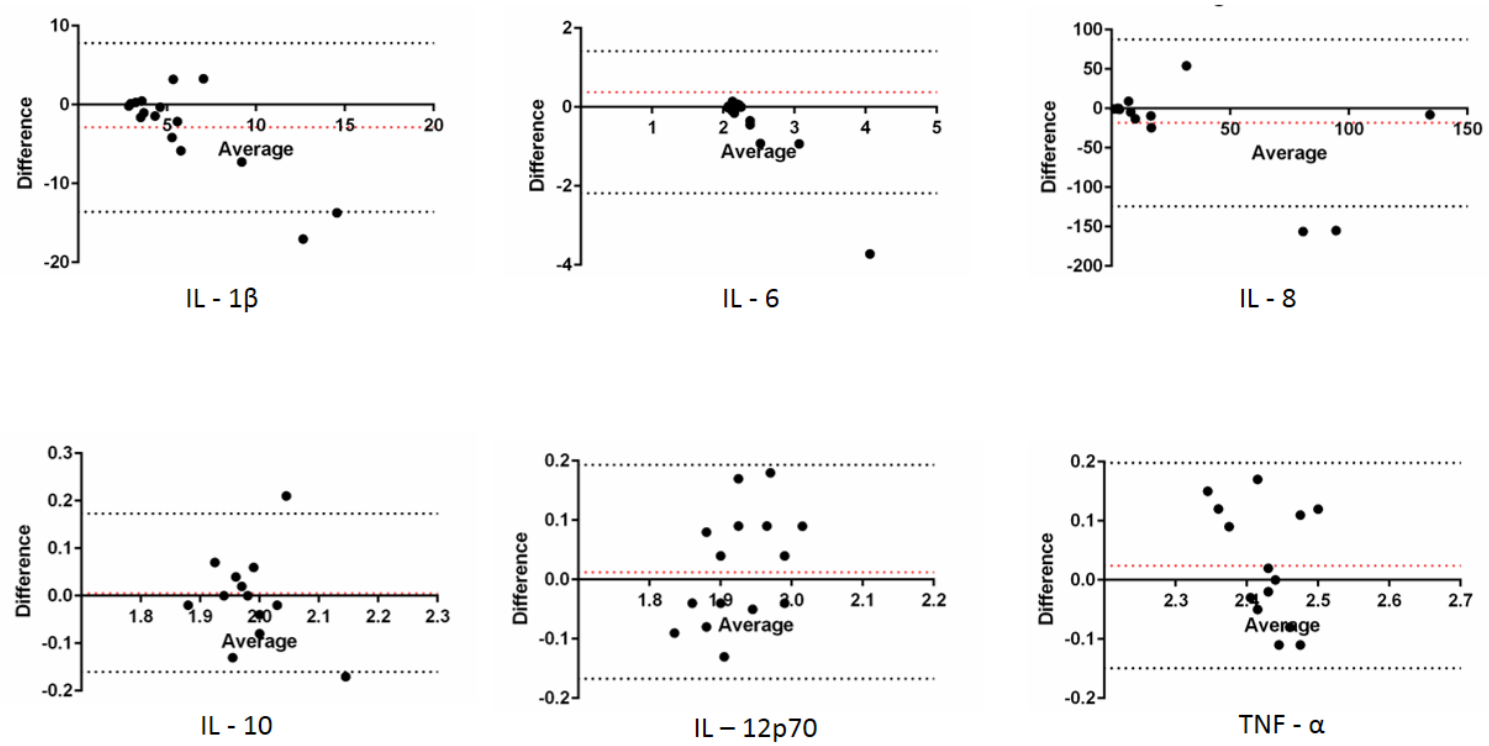


Figure 2: Bland Altman plots for periodontitis sites according with the cytokine evaluated.

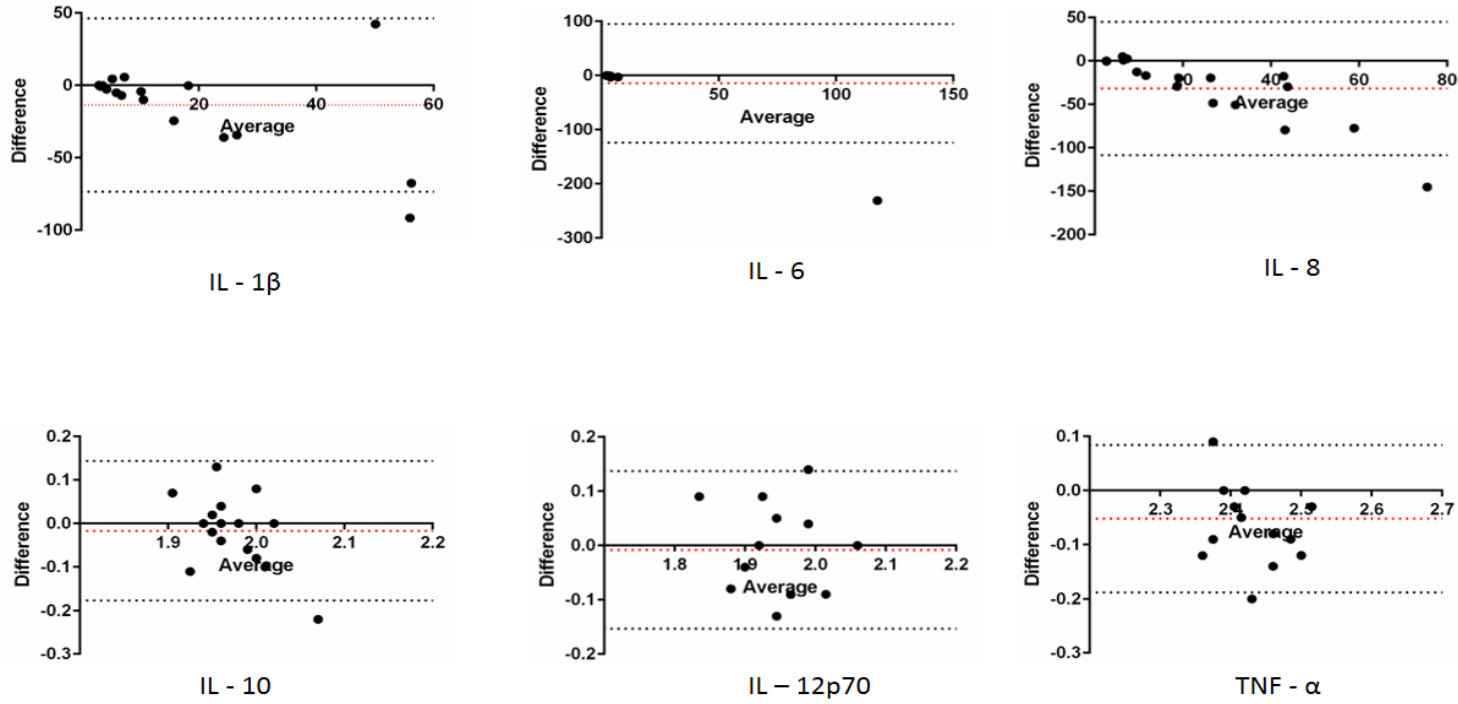
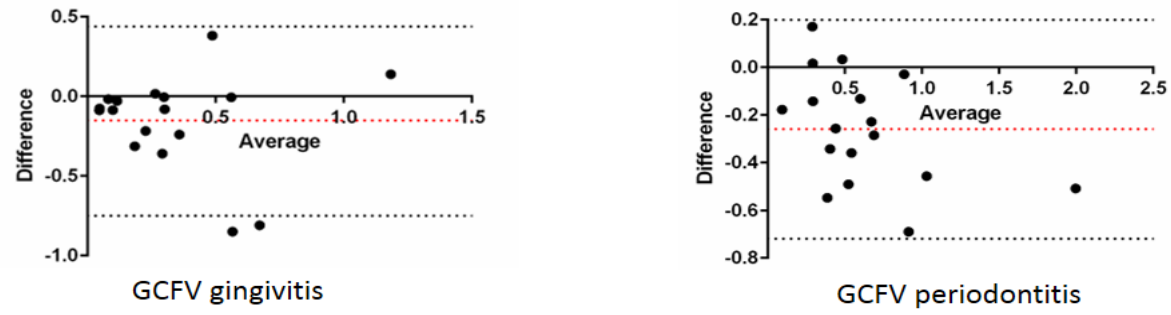


Figure 3: Bland Altman plots for Gingival Crevicular Fluid Volume (GCFV) at gingivitis and periodontitis sites.



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

A presente investigação contempla, à semelhança de estudos anteriores, mais uma etapa do processo de validação de um dispositivo teste para coleta de fluido crevicular (FCG). O FCG representa um indicador importante do processo saúde-doença periodontal e, como tal, é extensivamente avaliado, e majoritariamente, em estudos clínicos. A identificação de meios e métodos de coleta de FCG de fácil aplicação clínica se faz necessária na medida em que se tem o objetivo de fomentar pesquisas, facilitando a realização das mesmas.

O método de coleta mais divulgado na literatura é o de sucção. Por outro lado, o meio mais conhecido são tiras de papel que são inseridas no sulco/bolsa periodontal visando, exatamente, à absorção do FCG. Dentre os papéis absorventes, o PerioPaper® tem uso bastante difundido, não só em publicações na área da Periodontia, quanto, também, na de Implantodontia e Ortodontia. No entanto, as pesquisas no Brasil dependem da importação deste material que tem um alto custo.

Com a presente investigação foi possível apresentar resultados obtidos utilizando-se uma papel absorvente alternativo ao PerioPaper® no que se refere à capacidade de absorção de proteínas. Este papel alternativo já havia sido testado anteriormente, envolvendo avaliação à sua capacidade de absorção de FCG. Os resultados aqui reportados mostram que, apesar das diferenças existentes entre o dispositivo testado e o considerado referência (PerioPaper®), houve sempre a absorção das mesmas citocinas por ambos, confirmando a efetividade daquele meio de coleta. Estes resultados sugerem que o dispositivo teste possa representar acréscimos às pesquisas clínicas, pois são adequados não só quando se objetiva a quantificação volumétrica, mas, também, quando se deseja investigar a constituição do FCG. Para corroborar esse achados mais estudos são necessários.

6. REFERÊNCIAS

1. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *Journal of periodontology*. 1965;36:177-87.
2. Leishman SJ, Seymour GJ, Ford PJ. Local and systemic inflammatory responses to experimentally induced gingivitis. *Disease markers*. 2013;35(5):543-9.
3. Keukenmeester RS, Slot DE, Rosema NA, Van Loveren C, Van der Weijden GA. Effects of sugar-free chewing gum sweetened with xylitol or maltitol on the development of gingivitis and plaque: a randomized clinical trial. *International journal of dental hygiene*. 2014;12(4):238-44.
4. Li W, Wang RE, Finger M, Lang NP. Evaluation of the antigingivitis effect of a chlorhexidine mouthwash with or without an antidiscoloration system compared to placebo during experimental gingivitis. *Journal of investigative and clinical dentistry*. 2014;5(1):15-22.
5. Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontology 2000*. 2011;55(1):16-35.
6. Oppermann RV, Haas AN, Rosing CK, Susin C. Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America. *Periodontology 2000*. 2015;67(1):13-33.
7. Preshaw PM. Host response modulation in periodontics. *Periodontology 2000*. 2008;48:92-110.
8. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*. 1998;25(2):134-44.
9. Nonnenmacher C, Dalpke A, Mutters R, Heeg K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *Journal of microbiological methods*. 2004;59(1):117-25.
10. Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontology 2000*. 1994;5:7-25.
11. Listgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *Journal of periodontology*. 1976;47(1):1-18.
12. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA, Strausbaugh LD, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME journal*. 2013;7(5):1016-25.
13. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*. 2003;31:32-42.
14. Weidlich P, Lopes de Souza MA, Oppermann RV. Evaluation of the dentogingival area during early plaque formation. *Journal of periodontology*. 2001;72(7):901-10.
15. Lamster IB. Evaluation of components of gingival crevicular fluid as diagnostic tests. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*. 1997;2(1):123-37.
16. Sampaio E, Rocha M, Figueiredo LC, Faveri M, Duarte PM, Gomes Lira EA, et al. Clinical and microbiological effects of azithromycin in the treatment of generalized chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of clinical periodontology*. 2011;38(9):838-46.
17. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC oral health*. 2006;6 Suppl 1:S14.
18. Brill NK, B. . The passage of tissue fluid into the clinically healthy gingival pocket. *Acta Odontol Scand*. 1958;16:233-45.
19. Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1098:216-29.

20. Goodson JM. Gingival crevice fluid flow. *Periodontology 2000*. 2003;31:43-54.
21. Armitage GC. Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontology 2000*. 2004;34:109-19.
22. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology*. 2008;79(8 Suppl):1585-91.
23. Guentsch A, Kramesberger M, Sroka A, Pfister W, Potempa J, Eick S. Comparison of gingival crevicular fluid sampling methods in patients with severe chronic periodontitis. *Journal of periodontology*. 2011;82(7):1051-60.
24. Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *Journal of periodontology*. 2010;81(1):89-98.
25. Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, et al. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *Journal of clinical periodontology*. 2008;35(3):206-14.
26. Reinhardt RA, Stoner JA, Golub LM, Lee HM, Nummikoski PV, Sorsa T, et al. Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis. *Journal of periodontology*. 2010;81(2):251-9.
27. Kinney JS, Morelli T, Oh M, Braun TM, Ramseier CA, Sugai JV, et al. Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression. *Journal of clinical periodontology*. 2014;41(2):113-20.
28. Tozum TF, Hatipoglu H, Yamalik N, Gursel M, Alptekin NO, Ataoglu T, et al. Critical steps in electronic volume quantification of gingival crevicular fluid: the potential impact of evaporation, fluid retention, local conditions and repeated measurements. *Journal of periodontal research*. 2004;39(5):344-57.
29. Ciantar M, Caruana DJ. Periotron 8000: calibration characteristics and reliability. *Journal of periodontal research*. 1998;33(5):259-64.
30. Alencar FG, Kronbauer GC, Gomes SC. Validation of an alternative device for volumetric quantification of crevicular fluid. *Acta odontologica latinoamericana : AOL*. 2011;24(1):29-34.
31. Alencar FG, Gomes SC. Validation of an alternative absorbent paper for collecting gingival crevicular fluid. *R Periodontia*. 2009;19:85-90.
32. Johnson RB, Streckfus CF, Dai X, Tucci MA. Protein recovery from several paper types used to collect gingival crevicular fluid. *Journal of periodontal research*. 1999;34(6):283-9.
33. Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *Journal of clinical periodontology*. 2003;30(2):145-53.