



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Gisele Lago Martinez

**O efeito adjunto de uma suplementação alimentar à base de ômega-3 no
tratamento da periodontite: um estudo clínico e imunológico**

Rio de Janeiro

2015

Gisele Lago Martinez

O efeito adjunto de uma suplementação alimentar à base de ômega-3 no tratamento da periodontite: um estudo clínico e imunológico

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Orientadores: Carlos Marcelo da Silva Figueredo
Elisabeth Almer Boström

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB/B

M385	<p>Martinez, Gisele Lago. O efeito adjunto de uma suplementação alimentar à base de ômega-3 no tratamento da periodontite: um estudo clínico e imunológico / Gisele Lago Martinez. – 2015. 112f.</p> <p>Orientadores: Carlos Marcelo da Silva Figueredo e Elisabeth Almer Boström Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia e Institutet Karolinska.</p> <p>1. Periodontite. 2. Gengivite. 3. Ácidos graxos ômega-3. 4. Citocinas. 5. Líquido do sulco gengival. 6. Perda do osso alveolar. I. Figueredo, Carlos Marcelo da Silva. II. Boström, Elisabeth Almer. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 616.314</p>
------	---

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Gisele Lago Martinez

O efeito adjunto de uma suplementação alimentar à base de ômega-3 no tratamento da periodontite: um estudo clínico e imunológico

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Aprovada em 15 de Junho de 2015.

Orientadores:

Prof. Dr. Carlos Marcelo da Silva Figueredo
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Elisabeth Almer Boström
Karolinska Institutet

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Fernanda de Brito Silva
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior
Faculdade de Medicina - UERJ

Prof.^a Dra. Simone de Queiroz Chaves Lourenço
Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Kelb Bousquet Santos
Universidade de Brasília

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Marilene, e ao meu marido, Leonardo, que sempre me apoiam e auxiliam nas
nossas realizações.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pela minha vida, que eu prezo e me dedico para que cada segundo seja de evolução.

Devo agradecer à todos por estarem juntos a mim nas minhas escolhas de vida.

Aos meus pais, Marilene e Antonio Jorge (*in memorium*), pela dedicação a minha vida, por terem me proporcionado condições e momentos de aprendizado para minha formação pessoal e intelectual. À minha avó, Zenilda (*in memorium*), por todas as formas de dedicação a minha educação. Agradeço aos meus familiares por estarem sempre presentes na minha vida. Ao meu marido, Leonardo, pela enorme paciência, companheirismo, apoio e dedicação para me fazer feliz.

Ao meu orientador, Carlos Marcelo Figueredo, pelo aprendizado que pude desfrutar. À minha orientadora, Elisabeth Boström, que me recebeu em seu grupo, me ofereceu todo o apoio ao trabalho, me ensinou e incentivou, e permite nosso trabalho ser ainda mais divertido.

Ao professor colaborador, Anders Gustafsson, por todas as oportunidades e auxílios. Aos professores que participam da banca examinadora colaboração para a tese. Aos professores que durante minha trajetória acadêmica acrescentaram na minha formação, especialmente, Kelb Bousquet e Simone Lourenço.

Às colegas de profissão Danielle Camisasca, Flávia Braga, Denise Falcão e Fernanda Brito pela enorme ajuda e atenção, sempre disponíveis e prestativas, as considero como minhas referências. Aos colegas Carolina Barquete, Juliana Alves, Marcela Martins, Stephanie Zwicker, Reuben Clark, Mirjam Majster, Jeneen Panezai e Amal Al-Khotani pela imensa ajuda e por terem compartilhado da pesquisa comigo.

Aos alunos de iniciação científica e das disciplinas de periodontia e metodologia científica pela ajuda e aprendizado em conjunto. E aos funcionários da UERJ, especialmente, Maria Jorginete, Angelus, Renata e Denise por toda a ajuda. Aos pacientes pela compreensão, boa vontade e ajuda.

Aos amigos pelo carinho e momentos de tantas risadas.

Muito obrigada!

Uma criança, um professor, uma caneta e um livro podem mudar o mundo. Eles (Talibã) podem nos impedir de ir para a escola, mas não podem nos impedir de aprender. Nós percebemos a importância de nossa voz quando somos silenciados. Prefiro receber com honra seu corpo crivado de balas a ter notícias de sua covardia de batalha.

Malala Yousafzai

RESUMO

MARTINEZ, Gisele Lago. *O efeito adjunto de uma suplementação alimentar à base de ômega-3 no tratamento da periodontite: um estudo clínico e imunológico*. 2015. 112f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O objetivo foi avaliar se a suplementação com ômega (ω)-3 no tratamento não-cirúrgico da periodontite melhora os resultados clínicos e imunológicos. Avaliar os níveis séricos dos ω -3 e ω -6 na doença periodontal, investigar se o tratamento periodontal associado ou não a suplementação com ω -3 afeta os níveis séricos destes. Assim como avaliar a expressão de um painel de citocinas relacionadas a osteoclastogênese no fluido gengival (FG) de sítios dos pacientes com gengivite e periodontite, adicionalmente relacionar estas citocinas a densidade óptica do osso alveolar destes sítios. Por fim, investigar se as terapias propostas neste estudo afetam os parâmetros clínicos periodontais, a densidade óptica do osso alveolar e a expressão das citocinas no FG. Para isso foi realizado um ensaio clínico piloto, randomizado, duplo-cego, controlado-placebo, com vinte e um pacientes com periodontite e dezesseis com gengivite. Estes foram investigados para os níveis séricos dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL), ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosahexaenóico (DHA), ácidos docosapentaenóico (DPA), o ácido araquidônico (AA) usando cromatografia gasosa. O FG dos sítios controle-gengivite, controle-periodontite e destruído de pacientes com periodontite foi avaliado para Receptor ativador do fator nuclear kappa-B ligante (RANK-L), osteoprotegerina (OPG), a osteocalcina (OC), fator de necrose tumoral (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , interleucina (IL) -1 β , IL-4, IL-6 e IL-10, utilizando imunoensaio multiplex. Pacientes com periodontite foram subgrupados em grupos com e sem Síndrome Metabólica para avaliação dos AGPI-CL. Sítios dos pacientes com periodontite foram subgrupados em sítios sem e com considerável desmineralização óptica baseado na avaliação da densidade óptica alveolar representada pelos valores de pixels das radiografias intraorais digitais para avaliação das citocinas no FG. Pacientes com periodontite foram randomizados em raspagem e alisamento radicular mais suplementação com ω -3 (RAR+ ω -3) ou placebo (RAR+placebo), e foram reavaliados depois de quatro meses para AGPI-CL no soro, citocinas no FG e densidade alveolar óptica. Os níveis significativamente maiores dos AGPI-CLs foram observados em pacientes com periodontite em comparação com gengivite. A profundidade de bolsa mostrou uma correlação positiva significativa com DHA, DPA e AA. Após RAR+ ω -3, DPA, AA, AA/EPA e AA/DHA reduziram significativamente, e depois da RAR+placebo todos os níveis dos AGPI-CLs reduziram significativamente. Os níveis das citocinas, IFN- γ , IL-4, IL-10, RANK-L e OC, no FG de sítios controle-gengivite foram menores comparados aos sítios controle-periodontite e destruído. O mesmo resultado foi observado para os níveis da IL-1 β , IL-6 e OPG em comparação com sítios destruídos. Pacientes com periodontite apresentaram níveis mais baixos de IL-1 β e OPG em sítios controle-periodontite comparado aos destruídos. Após RAR+ ω -3, o nível da IL-4 aumentou e os níveis de OC, IFN- γ e IL-10 diminuíram. Não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais para a densidade alveolar óptica e parâmetros. Em conclusão, os níveis séricos dos AGPI-CLs são afetados pela gravidade de doença periodontal e diferem com a presença da síndrome metabólica. Citocinas relacionadas a osteoclastogênese no FG refletem a gravidade periodontal e diferem com densidade óptica alveolar alterada. A suplementação com ω -3 não melhora clínica ou imunologicamente o resultado do tratamento periodontal.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Citocinas. Omega-3. Osso alveolar. Periodontite. Radiografia.

ABSTRACT

MARTINEZ, Gisele Lago. *The adjunctive effects of Omega-3 dietary supplementation in the treatment of periodontitis: a clinical and immunological study*. 2015. 112f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The aim was to test whether omega (ω)-3 supplementation associated to non-surgical treatment of periodontitis improves clinical and immunological results. Evaluate the serum levels of ω -3 and ω -6 in periodontal disease, hence, to investigate whether periodontal treatment with or without ω -3 supplementation affects serum levels of these. Therefore, to evaluate the expression of a panel of cytokines related to osteoclastogenesis in the gingival crevicular fluid (GCF) sites of patients with gingivitis and periodontitis, additionally relate these cytokines with optical alveolar bone density in these sites. Finally, to investigate whether the therapies proposed in this study affect the clinical periodontal parameter, the optical density of the alveolar bone and the expression of cytokines in GCF. Then was conducted a pilot clinical trial, randomized, double-blind, placebo-controlled, with twenty-one patients with periodontitis and sixteen with gingivitis. These were investigated for blood levels of long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA), eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), docosapentaenoic acid (DPA), arachidonic acid (AA) using gas chromatography. The GCF of the sites of control-gingivitis, control-periodontitis and destroyed from patients periodontitis were evaluated for receptor activator of kappa-B ligand nuclear factor (RANK-L), osteoprotegerin (OPG), osteocalcin (OC), tumor necrosis factor (TNF) $-\alpha$, interferon (IFN) $-\gamma$, interleukin (IL) -1β , IL-4, IL-6 and IL-10 using multiplex immunoassay. Patients with periodontitis were subgrouped in groups with and without metabolic syndrome to evaluate the LC-PUFA. Sites of patients with periodontitis were subgrouped at sites with and without considerable optical demineralization based on the evaluation of alveolar optical density represented by the pixel values of the digital intraoral radiographs for evaluation of cytokines in GCF. Patients were randomized into the periodontal scaling and root planing more ω -3 supplementation (ω -3 SRP +) or placebo (SRP + placebo), and were assessed after four months to LC-PUFA in serum, cytokines in GCF and alveolar optical density. The significantly higher levels of LC-PUFA were observed in patients with periodontitis compared to gingivitis. The pocket depth showed a significant positive correlation with DHA, DPA and AA. After RAR + ω -3, APD, AA, AA / AA and EPA / DHA reduced significantly, and, after SRP + placebo, all levels of LC-PUFA reduced significantly. The levels of cytokines, IFN- γ , IL-4, IL-10, and OC RANK-L, from control-gingivitis sites GCF were lower compared to control-periodontitis and destroyed sites. The same result was observed for levels of IL- 1β , IL-6 and OPG compared to destroyed sites. Periodontitis patients had lower levels of IL- 1β and OPG in control-periodontitis compared to destroyed sites. After SRP + ω -3, the level of IL-4 and OC increased and levels of IFN- γ and IL-10 decreased. There were no significant differences between the experimental groups to optical density and clinical parameters. In conclusion, serum levels of LC-PUFA are affected by periodontal disease severity and differ in the presence of the metabolic syndrome. Cytokines related to osteoclastogenesis in GCF reflect the periodontal severity and differ with impaired alveolar optical density. Ω -3 supplementation does not improve clinical or immune result of non-surgical periodontal treatment.

Keywords: Alveolar bone. Cytokines. Fatty acids. Omega-3. Periodontitis. Radiography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Análise óptica periodontal e ilustração do subgrupo de sítios.....	22
Figura 2 -	Ácidos graxos poli-insaturado de cadeia longa séricos nos pacientes com gengivite e periodontite.....	27
Figura 3 -	Dados ópticos periodontais dos participantes do estudo.....	30
Figura 4 -	Nível de citocinas no fluido gengival dos sítios controle-gengivite e controle-periodontite e destruídos dos pacientes com periodontite.....	32
Figura 5 -	Níveis de citocinas no fluido gengival dos sítios com e sem considerável desmineralização óptica dos grupos controle-periodontite e destruído dos pacientes com periodontite.....	34
Figura 6 -	Níveis séricos dos ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa dos grupos de intervenção.....	37
Figura 7 -	Dados clínicos e ópticos periodontais dos grupos de intervenção.....	39
Figura 8 -	Nível de citocinas no fluido gengival dos sítios controle-periodontite e destruídos dos grupos de intervenção.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características clínicas e demográficas dos pacientes com gengivite e periodontite.....	25
Tabela 2 -	Valores médios \pm desvio padrão e mediana (amplitude) para o índice bioquímico dos pacientes com gengivite e periodontite.....	28
Tabela 3 -	Características clínicas e demográficas dos pacientes dos grupos de intervenção.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AGPI-CL	Ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa
ANCOVA	Análise de covariância
DHA	Ácido docosaenoico
DP	Desvio padrão
DPA	Ácido docosapentaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAO	Organização para Alimentação e Agricultura
FG	Fluido gengival
GLM	Modelo linear geral
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
IP	Índice de placa
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
OC	Osteocalcina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	Osteoprotegerina
NIC	Nível de inserção clínica
PBS	Profundidade de bolsa à sondagem
QFA	Questionário de frequência alimentar
RANKL	Receptor ativador do fator nuclear kappa β ligante
RAR	Raspagem e alisamento radicular
ROI	Região de interesse
SM	Síndrome metabólica
SS	Sangramento à sondagem
TNF	Fator de necrose tumoral
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVO	17
2	MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1	Grupo do estudo	18
2.2	Questionário de frequência alimentar e estado nutricional	19
2.3	Coleta sanguínea e análise laboratorial	19
2.4	Medidas e seleção dos sítios periodontais	21
2.5	Densidade e altura óptica alveolar	21
2.6	Coleta do fluido gengival e imunoensaio	23
2.7	Intervenção com ômega-3 e procedimentos do estudo	23
2.8	Manuseio dos dados e análise estatística	24
3	RESULTADOS	25
3.1	Características clínicas e demográficas dos pacientes com gengivite e periodontite	25
3.2	Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa e parâmetros sanguíneos biológicos dos pacientes com gengivite e periodontite	26
3.3	Características clínicas e ópticas dos sítios controle-gengivite, controle-periodontite e destruído	28
3.4	Citocinas no fluido gengival dos sítios controle-gengivite, controle-periodontite e destruído	31
3.5	Citocinas no fluido gengival dos sítios com e sem considerável desmineralização ópticas controle-periodontite e destruídos	33
3.6	Características clínicas e óptica dos pacientes com periodontite dos grupos de intervenção	35
3.7	Mudanças dos níveis séricos dos ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa dos pacientes com periodontite dos grupos de intervenção	36
3.8	Mudanças clínicas e óptica dos sítios controle-periodontite e destruído dos pacientes com periodontite dos grupos de intervenção	38

3.9	Mudanças do nível de citocinas no fluido gengival dos sítios controle-periodontite e destruído dos pacientes com periodontite dos grupos de intervenção.....	39
4	DISCUSSÃO.....	43
	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	APÊNDICE A - Artigo I- Serum levels of long-chain polyunsaturated fatty acids in patients with periodontal disease.....	64
	APÊNDICE B - Artigo II- The impact of non-surgical periodontal treatment on serum levels of long chain-polyunsaturated fatty acids: a pilot randomized clinical trial.....	72
	APÊNDICE C - Manuscrito III- Osteoclastogenesis related cytokines and alveolar optical density in periodontal disease.....	79
	ANEXO A – Comitê de ética em pesquisa.....	108
	ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	109
	ANEXO C – Questionário de frequência alimentar e estado nutricional.....	110

INTRODUÇÃO

Esta tese é baseada nos seguintes artigos / manuscrito, que serão referidos ao longo do texto por algarismos romanos:

I– Serum levels of long-chain polyunsaturated fatty acids in patients with periodontal disease. Figueredo CM, Martinez GL, Koury JC, Fischer RG, Gustafsson A. J Periodontol. 2013 May;84(5):675-82.

doi: 10.1902/jop.2012.120171. Epub 2012 Jul 6. PubMed PMID: 22769444.

II– The impact of non-surgical periodontal treatment on serum levels of long chain-polyunsaturated fatty acids: a pilot randomized clinical trial.

Martinez GL, Koury JC, Brito F, Fischer RG, Gustafsson A, Figueredo CM.

J Periodontal Res. 2014 Apr;49(2):268-74.

doi: 10.1111/jre.12104. Epub 2013 May 31. PubMed PMID: 23721647.

III– Osteoclastogenesis related cytokines and alveolar optical density in periodontal disease.

Manuscrito 2015

As doenças periodontais, gengivite e periodontite, caracterizam-se por uma resposta inflamatória das estruturas de suporte dos dentes contra o biofilme bacteriano sobre as superfícies dos dentes. (1) A inflamação é marginalmente restrita a gengivite, ao passo que a periodontite é caracterizada pela destruição irreversível de tecidos e perda de ligamento periodontal e osso alveolar. (2-3) Em alguns indivíduos a gengivite não evolui para periodontite (1), no entanto, o fato de que a periodontite é sempre precedida de gengivite sugere reações inflamatórias hiper ou aberrantes de respostas do hospedeiro.

O conceito de modulação da resposta do hospedeiro para alcançar melhores resultados clínicos durante a terapia periodontal foi introduzido nas últimas décadas. (4) Recentemente, a suplementação com ômega (ω)-3 tem sido utilizada com a intenção de estimular a expressão de moléculas envolvidas na resolução da inflamação, tais como resolvinas. (5) Ω -3 de origem dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL) são ácidos graxos essenciais que devem ser fornecidos por fontes dietéticas. (6) Derivados dos ω -3 AGPI-CL, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosaexaenoico (DHA) e ácido docosapentaenóico (DPA), e AGPI-CL derivado do ω -6, ácido araquidônico (AA), estão envolvidos na modulação da inflamação. Eles podem tanto ter efeitos moduladores da intensidade e duração do processo inflamatório para o aumento quanto para a diminuição deste. (7)

A menor ingestão de ω -3 AGPI-CL juntamente com proporções mais elevadas de ω -6 / ω -3 têm sido observadas na população ocidental e pode estar relacionada com uma alta

prevalência de doenças crônicas, incluindo câncer (8), endometriose (9), doenças inflamatórias e autoimunes (10) e doenças cardiovasculares (11). A Organização para Alimentação e Agricultura em colaboração com a Organização Mundial de Saúde (FAO / OMS) recomendaram recentemente um consumo combinado dos derivados do ω -3 AGPI-CL, EPA e DHA. O consumo de 250 mg / dia foi recomendado a indivíduos saudáveis para a prevenção de doenças. Os elevados níveis de consumo de ω -3 AGPI-CL, tais como 3 g / dia, foram recomendados para reduzir a inflamação e outros fatores de risco cardiovascular, sem efeitos adversos em estudos randomizados de curto e médio prazo (12-13).

A suplementação com ω -3 AGPI-CL tem sido utilizada para aumentar os níveis séricos de ω -3 AGPI-CL, que, conseqüentemente, possibilitam um efeito positivo sobre a resolução da inflamação. (5) Tong et al. (14) observaram que os pacientes saudáveis suplementados com óleo de peixe, 3 g / dia por 1 mês, mostraram 6,5 vezes maior nível de EPA em comparação com o grupo placebo. Dawczynski et al. (15) mostraram que suplementação com ω -3 AGPI-CL durante 3 meses aumenta significativamente os níveis de séricos de DHA e EPA em mulheres com artrite reumatoide. Uma revisão sistemática recente mostrou um consistente, embora modesto, benefício de ω -3 AGPI-CL na artrite reumatoide (16). Na doença inflamatória do intestino, os resultados são inconsistentes (17). Em modelos periodontais em animais, a suplementação dietética com ω -3 AGPI-CL tem sido mostrada ser eficaz (18). Alguns ensaios clínicos avaliaram a relação entre ω -3 AGPI-CL suplementação e os resultados clínicos periodontais (19-21, 5), no entanto, pouco se sabe sobre o efeito da doença e do tratamento periodontal no nível sérico dos AGPI-CL, além dos promissores efeitos clínicos e imunológicos da suplementação com ω -3 AGPI-CL relacionados ao osso alveolar.

Apesar de vários estudos caracterizarem as diferenças nas respostas inflamatórias locais na gengivite e periodontite, pouco tem sido relatado sobre as alterações na densidade do osso alveolar. (22-26) O diagnóstico de periodontite é baseado em medidas clínicas da destruição tecidual irreversível ocorrida, enquanto que o diagnóstico inicial para a atividade e progressão da doença previamente a destruição irreversível ainda está faltando. A inflamação periodontal compartilha de várias características patogênicas de outras doenças inflamatórias, principalmente de característica osteolística, incluindo artrite reumatóide. O processo inflamatório envolve infiltração local de leucócitos que, junto com células residentes, liberam uma variedade de mediadores inflamatórios que medeiam a destruição dos tecidos moles e duros, incluindo osso alveolar. As avaliações radiográficas, ou imagens ópticas, de erosão óssea reflete a remodelação óssea; diferença de formação e reabsorção óssea. Até agora, as

avaliações de densidade óssea são raramente usadas para diagnosticar ou avaliar doenças periodontais embora as radiografias sejam amplamente usadas no auxílio a avaliação periodontal. Enquanto que a erosão e densidade óssea constituem recursos e critérios de classificação no diagnóstico e avaliação de atividade da artrite reumatóide contribuindo também para a identificação de pacientes com progressão ou remissão da doença. (27-30)

As citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF) α , interleucina (IL) 1β , e IL-6 são centrais para a patogênese da destruição óssea por indução do receptor ativador do fator nuclear kappa B-ligante (RANK-L) que induzem a diferenciação das células mielóides precursoras da reabsorção óssea, osteoclastos, diretamente ou independentemente por RANK-L. As citocinas, TNF- α , IL- 1β , e IL-6, são reguladas para expressão na artrite reumatóide (31) e em periodontite, medidos localmente no fluido gengival (32). Identificação de potenciais biomarcadores substitutos relacionados com o dano ósseo é importante, estes podem prever o prognóstico da doença, diminuir o risco de erros de classificação e explicar injustificada resposta ao tratamento. Nas artrite reumatoide, os biomarcadores tais como anticorpos de proteína anti-citrulinada e fator reumatóide que predizem ou refletem a erosão óssea (33-35) fazem parte dos critérios de avaliação da artrite reumatóide, no entanto, em periodontite, os critérios de classificação de erosão óssea e biomarcadores relacionados são até agora inexistentes. A identificação desses marcadores poderia ensejar intervenções terapêuticas mais individualizadas que suprimem a maior destruição óssea, além de terapia convencional.

Os ácidos graxos que derivam de componentes alimentares são os principais componentes de todas as membranas celulares e de precursores de derivados de moléculas de sinalização. (36) O potencial papel modulador do ω -3, EPA e DHA, na inflamação e destruição óssea foi avaliado na artrite reumatoide, em que a suplementação com ω -3 diminuiu os níveis circulantes da IL- 1β (37), TNF- α e RANK-L (38) e diminuiu a produção de IL-1 por monócitos. (39) Ao menos em parte, ω -3 tem um efeito inibidor sobre o fator nuclear do fator de transcrição Kappa β (40) que conduz e regula negativamente a subsequente supressão de TNF- α e do fator de estimulação de colônias de macrófagos e RANKL nos estágios iniciais da osteoclastogênese. (41) Ω -3 pode reduzir ainda mais a atividade e o número de osteoclastos sem alterar a atividade e número de osteoblastos (41), além de aumentar os marcadores de formação óssea, tal como a fosfatase alcalina específica do osso e majorar a densidade mineral óssea. (42) A evidência epidemiológica sugere que dietas ricas em ω -3 podem ser benéficas para a manutenção dos componentes ósseos e estudos relatam efeitos favoráveis do ω -3 sobre marcadores de densidade mineral óssea ou de remodelação óssea. (43) A periodontite experimental mostra menor reabsorção óssea alveolar

em ratos tratados com ω -3 suplementação. (18) A adição de suplementação com ω -3 em seres humanos após cirurgia periodontal resulta em uma diminuição de IL-1 β e aumento da expressão de IL-10 no fluido gengival. (21) A literatura converge à hipótese de que uma suplementação dietética à base de ω -3 associada ao tratamento não-cirúrgico da periodontite crônica melhora os resultados clínicos, relativos as estruturas de tecido mole e duro, e imunológicos. No entanto, até agora, os estudos em humanos sobre o impacto da suplementação com ω -3 em conjunto com a terapia não-cirúrgica no osso alveolar e citocinas do fluido gengival ainda não foram relatados na literatura, o que torna essa investigação interessante e pertinente.

1 OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi avaliar se uma suplementação dietética à base de ω -3 associada ao tratamento não-cirúrgico da periodontite crônica melhora os resultados clínicos, relativos as estruturas de tecido mole e duro, e imunológicos.

Os objetivos auxiliares foram avaliar os níveis séricos dos ω -3 e ω -6 na doença periodontal, por conseguinte, investigar se o tratamento periodontal associado ou não a suplementação com ω -3 afeta os níveis séricos destes. Assim como avaliar a expressão de um painel de citocinas relacionadas a osteoclastogênese no fluido gengival (FG) de sítios dos pacientes com gengivite e periodontite, adicionalmente relacionar estas citocinas a densidade óptica do osso alveolar destes sítios. Por fim, investigar se as terapias propostas neste estudo afetam os parâmetros clínicos periodontais, a densidade óptica do osso alveolar e a expressão das citocinas no FG.

Os objetivos específicos incluíram a avaliação das seguintes variáveis: (1) medidas clínicas periodontais; (2) os níveis circulantes de AGPI-CL (DHA, EPA, DPA e AA); (3) nível de RANK-L, OPG, IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-10, OC, INF- γ e TNF- α no fluido gengival; e (4) densidade óptica da crista óssea alveolar.

Os objetivos dos artigos / manuscrito:

Artigo I

- avaliar se os níveis séricos dos ω -3 e ω -6 AGPI-CL são afetados pela gravidade da doença periodontal;

Artigo II

- investigar se o tratamento periodontal associado a suplementação com ω -3, durante 4 meses, afeta os níveis séricos dos AGPI-CL e melhora o resultado clínico periodontal.

Manuscrito III

- avaliar a expressão de um painel de citocinas relacionadas a osteoclastogênese no fluido gengival de sítios inflamados de pacientes com gengivite e periodontite e sítios com progressão de destruição óssea em pacientes com periodontite, e relacionar as citocinas a densidade óptica; e

- investigar o efeito do tratamento periodontal não-cirúrgico, com ou sem suplementação de ω -3 na densidade óptica do osso alveolar e a expressão de citocinas no fluido gengival em pacientes com periodontite.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Grupo do estudo

Adultos, acima de 18 anos, com periodontite crônica generalizada que procuraram tratamento na Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brasil, entre 2010 e 2011 foram elegíveis para inclusão. Uma experiente especialista em periodontia diagnosticou os pacientes de acordo com os critérios da Academia Americana de Periodontia (44). Os critérios de inclusão foram: ter periodontite de moderada a grave sem tratamento prévio (perda de inserção ≥ 3 mm e bolsa periodontal ≥ 5 mm) em ao menos quatro sítios interproximais de dentes diferentes, e ter, no mínimo, 15 dentes próprios. Os critérios de exclusão foram: doença sistêmica diagnosticada, utilização de antibióticos ou medicamentos anti-inflamatórios não-esteróides nos últimos 6 e 3 meses, respectivamente, utilização contínua de medicação conhecida por afetar a condição periodontal, tais como anticonvulsivos (fenitoína) ou imunossupressores (ciclosporina, nifedipina, nitrendipina, oxidipine, felodipina, amlodipina, verapamil e diltiazem), o uso contínuo de ômega-suplementos nutricionais ou tratamento periodontal prévio e / ou ortodôntico nos últimos 12 meses. Um grupo de pacientes de gengivite induzida por placa foi usado como controle. Os critérios de inclusão para os pacientes com gengivite foram: no mínimo 20 dentes próprios, sem perda de inserção interproximal e presença de sangramento em $\geq 30\%$ dos sítios. Os critérios de exclusão foram aplicados os mesmos usados para os indivíduos com periodontite. O Comitê de Ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto (UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) aprovou o estudo (protocolo 2714/2010) e o termo de consentimento livre e esclarecido por escrito foi recebido por todos os participantes (Artigos / Manuscrito I; II; III). Este estudo foi considerado um ensaio clínico piloto, randomizado, duplo-cego, controlado-placebo.

2.2 Questionário de frequência alimentar e estado nutricional

O questionário de frequência alimentar (QFA) foi respondido pessoalmente durante uma entrevista com uma nutricionista experiente (MAM) (Apêndice C). O QFA foi preenchido no início do estudo e, novamente, em quatro meses para os grupos de intervenção. O questionário foi projetado para capturar a ingestão habitual de alimentos, incluindo questões relacionadas com 30 itens alimentares, agrupados de acordo com o padrão de refeição brasileira. Itens no QFA incluem uma extensa lista de alimentos específicos para os frutos do mar, peixes, nozes, semente e óleo de linhaça, e óleos de fígado, bacalhau e canola. Para cada item, as categorias variaram de nunca a um número de vezes em cada dia, semana ou mês. Os pacientes foram orientados a não alterarem sua dieta durante a pesquisa (Artigo/Manuscrito II; III).

A massa corporal total foi medida com uma balança portátil com precisão de 0,1 kg. A altura foi medida com precisão de 0,5 cm. A partir dos valores de peso e altura, o índice de massa corporal (IMC) foi definido como a razão entre o peso em kg e a altura em metros ao quadrado (massa corporal total / altura²). A adequação do índice de massa corporal foi determinada de acordo com a OMS - Comissão do estado físico (eutrófico $18,5 \leq 24,99 \text{ kg} / \text{m}^2$, excesso de peso $25 \leq 29,99 \text{ kg} / \text{m}^2$ e obeso $\geq 30 \text{ kg} / \text{m}^2$). (45) (Artigo/Manuscrito II, III)

2.3 Coleta sanguínea e análise laboratorial

Os pacientes foram orientados a não comerem por 12 horas antes da coleta da amostra. As amostras de sangue (20 ml) foram obtidas na parte da manhã (não mais tarde do que 8:00) por punção venosa. Quatro ml foram transferidos para tubos de vidro contendo 7,2mg K2-EDTA (Vacutainer BD, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) para a hemoglobina glicada e contagem de sangue. Outros 4 ml foram transferidos para tubos de vidro com 6 mg de NaF e 12 mg de Na2EDTA (BD Vacutainer) para análise de glicose. Oito ml foram transferidos para tubos de vidro com ativador coagulante (BD Vacutainer) para perfil lipídico, proteína C-reativa de alta sensibilidade (hs-CRP), insulina (Artigos / Manuscrito I; II; III), e 2 ml para EPA, DHA, DPA e AA (Artigos I; II). Todas as amostras foram imediatamente centrifugadas durante cinco minutos, com exceção do K2-EDTA (Vacutainer BD), e utilizadas para a

análise imediata ou armazenadas a -80°C . A coleta de sangue foi realizada no início do estudo e quatro meses após. (Artigos / Manuscrito I; II; III)

Os métodos de análise para a avaliação bioquímica do sangue foram para a glicose, os triglicerídeos, colesterol total, colesterol de alta densidade (HDL-C), colesterol de baixa densidade (LDL-C), colesterol de muito baixa densidade (VLDL-C) o método enzimático colorimétrico, para a hemoglobina glicada foi HPLC, para a contagem de leucócitos foi automação - coulter t890, e para a insulina foi quimioluminescência, para a proteína C-reativa foi o método nefelometria, todos foram medidos usando um analisador automático de rotina do laboratório (DLE - Diagnósticos laboratoriais Especializados - Medicina laboratorial, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). (Artigos / Manuscrito I; II; III)

A síndrome metabólica é definida de acordo com a Adult Treatment Panel III (ATP III) (Executive Summary 2001) pelos critérios de presença de 3 ou mais de 5 dos seguintes fatores: obesidade central (circunferência da cintura ≥ 102 cm para homens e ≥ 88 cm para mulheres), elevado nível de triglicérides (≥ 150 mg / dl) ou tratamento específico para essa anormalidade lipídica; reduzido HDLcolesterol (<40 mg / dL em homens e <50 mg / dL em mulheres) ou tratamento específico para essa anormalidade lipídica, pressão arterial elevada (sistólica ≥ 130 mmHg ou diastólica ≥ 85 mmHg) ou tratamento de hipertensão previamente diagnosticada); elevado nível da glicose plasmática em jejum (≥ 110 mg / dL) ou previamente tratados. (46) Por meio dos resultados de análise clínica e sanguínea oito pacientes do grupo periodontite foram diagnosticados com síndrome metabólica de acordo com Adult Treatment Panel III (2001). Não houve dados suficientes para confirmar o diagnóstico de síndrome metabólica em 2 pacientes do grupo periodontite. Nenhum paciente do grupo gengivite apresentou diagnóstico para a síndrome metabólica. Assim, o grupo periodontite foi subagrupado em dois subgrupos, um subgrupo sem e outro com a síndrome metabólica.

AGPI-CLs no soro foram analisados após a extração dos lipídios e tendo sido a oxidação evitada por meio da adição de hidroxitolueno butilado. A fase orgânica que contém os lipídeos totais foram secos sob fluxo e o resíduo foi metilado. AGPI-CLs no soro foram analisados por cromatografia em fase gasosa. A identificação e quantificação de picos cromatográficos dos gases de ésteres metílicos de ácidos graxos foram realizadas por um padrão comercial (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, EUA). (Artigos I, II)

2.4 Medidas e seleção dos sítios periodontais

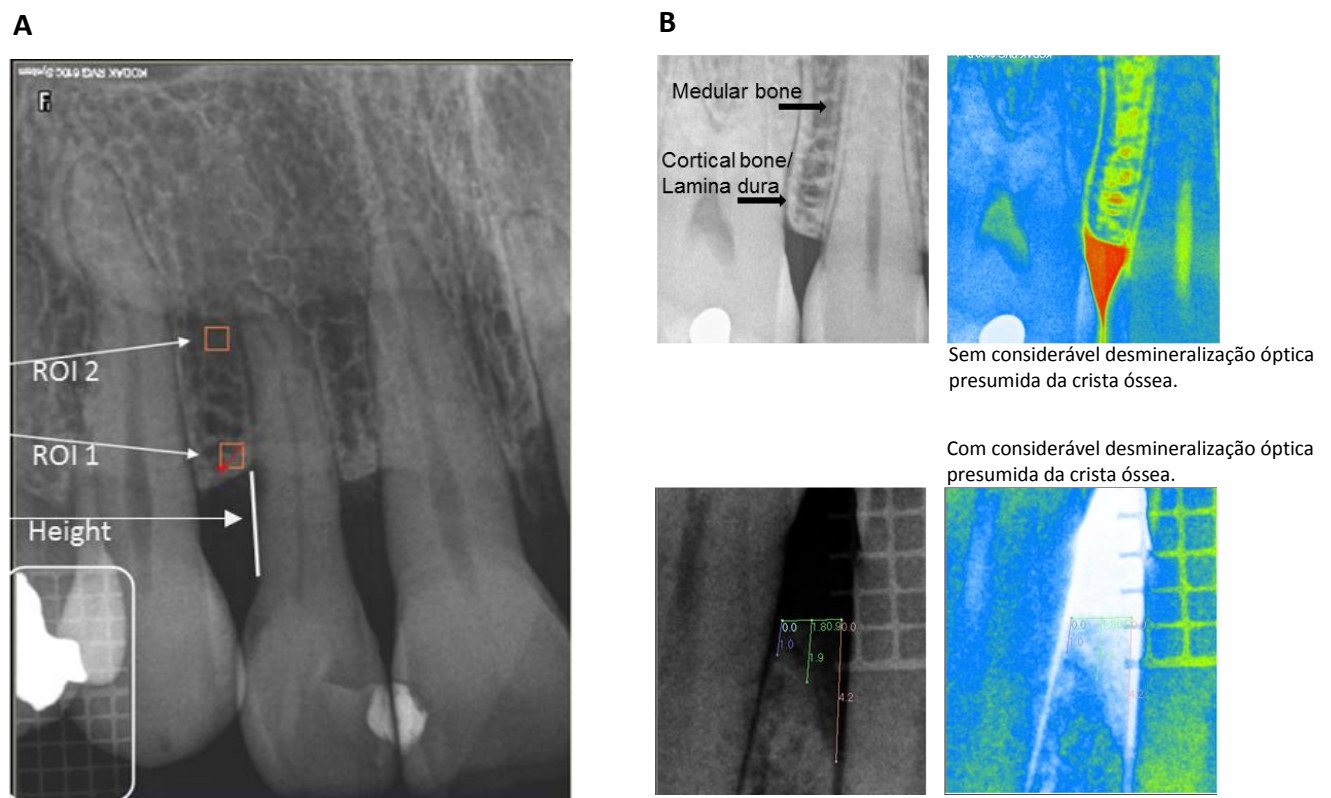
O exame periodontal incluiu sangramento à sondagem (SS), índice de placa de O'Leary (IP), profundidade de bolsa à sondagem (PBS), e nível de inserção clínico (NIC). A PBS e NIC foram registrados em 6 sítios por dente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual), excluindo os terceiros molares, utilizando uma sonda computadorizada periodontal (Florida Probe, Gainesville, FL, EUA). A concordância intraexaminador foi de 98% dentro do intervalo de $\pm 0,5$ milímetros para PBS e NIC (Artigos / Manuscrito I; II; III). Um sítio inflamado interproximal, definido por vermelhidão, inchaço, sangramento com a estimulação, ausência de bolsas periodontais verdadeiras em todas as faces e sem perda de inserção interproximal >1 mm, e sem restaurações dentárias marginais / aparelhos ou cavidade cariosa, foi selecionado de cada indivíduo, referido como sítio controle-gengivite e controle-periodontite (PBS ≤ 3 mm, NIC ≤ 1 mm) no grupo gengivite e periodontite, respectivamente. No grupo de pacientes com periodontite, um sítio com destruição de tecidos periodontais foi selecionado, designado por sítio destruído (PBS ≥ 4 mm, NIC ≥ 2 mm). No total, 15 sítios controle de pacientes com gengivite, 20 sítios controle-periodontite e 20 sítios destruído do grupo periodontite foram selecionados. (Manuscrito III)

2.5 Densidade e altura óptica alveolar

A densidade óptica alveolar (pixels / mm²) nas regiões de interesse (ROI) interproximais e altura da distância entre a junção cimento-esmalte e crista do osso alveolar (mm) foram avaliados através de radiografias intraorais digitais, como descrito anteriormente (Rosa et al 2008), utilizando a Kodak Radiografia Digital Sistema RVG 6100 (Rochester, NY, EUA). O aparelho de raios-X Intraoral KODAK 2200 foi usado (Rochester, NY, EUA) e radiografias foram capturadas em 70kV, 7 mA e ajustadas ao fator 3 com um tempo de exposição para cada região do arco dentário de acordo com o fabricante. Todas as medidas de proteção contra as radiações ionizantes, recomendadas na literatura foram respeitadas. O ROI foi realizado utilizando uma grade de metal com vários quadrados 1.0mm², preso ao sensor (Kodak, Rochester, NY, EUA) (Figura 1A). A localização dos ROIs não se sobrepõem a

qualquer parte da superfície dentária, espaço do ligamento periodontal ou lâmina dura adjacente. O ROI 1 foi colocado na porção mais coronal da crista do osso alveolar, e a ROI de controle (ROI 2), foi colocada a 5 mm relativamente ao ROI 1 (Figura 1A). A densidade óptica alveolar foi calculada por pixels usando uma escala de cinza que varia de 0 a 256, representado o preto e o branco, respectivamente. A diferença na densidade óptica alveolar entre ROI 1 - ROI 2 (Δ ROI 1-2) representam a presumida mineralização (pixels positivos) / desmineralização (pixels negativos) óptica da crista óssea alveolar para cada sítio (Figura 1B). A altura óptica da perda óssea alveolar, definida pela distância desde a junção cimento-esmalte à crista do osso alveolar, foi medido em milímetros (mm) (Figura 1A). As avaliações radiográficas foram realizadas por dois examinadores calibrados (GLM e FB) com 99% de concordância dentro de ± 5 pixels para densidade óptica alveolar em ROI e $\pm 0,1$ mm para a altura óptica da perda óssea alveolar. (Manuscrito III)

Figura 1 - Análise óptica periodontal e ilustração do subgrupo de sítios.



Legenda: A - Os parâmetros ópticos periodontais por raios-X periapical mostram a altura óptica da perda óssea da crista alveolar e densidade óptica alveolar da região de interesse (ROI) 1 e 2. B - A ilustração é representativa de sítios com e sem considerável desmineralização óptica da crista óssea presumida por radiografia periapical padrão (filtro preto e branco) e colorida.

2.6 Coleta do fluido gengival e imunoenensaio

O fluido gengival foi recolhido entre 8h e 12h como anteriormente descrito (Figueredo e Gustafsson 1998). Resumidamente, a placa supragengival foi cuidadosamente removida e os sítios de amostragem foram isolados utilizando rolos de algodão, e secos cuidadosamente com uma seringa de ar. As amostras foram coletadas usando o tipo de dispositivo 251 Fill-Master (Delta Medical Scientific, Haandvaerkerparken, Hedinge, Dinamarca), adaptado para a liberação controlada de tampão fosfato-salino, e ligado aos aspiradores da unidade. As amostras foram recolhidas em tubos com 500 uL de fosfato-salina tamponada e centrifugados a 3,000xg durante 5 min, após os sobrenadantes foram separados do sedimento e congelados a -80 °C até análise. A coleta do fluido gengival foi realizada uma semana após as radiografias serem realizadas e analisadas a fim de selecionar os sítios de coleta com base na imagem radiográfica. (Manuscrito III)

Medições de um painel de citocinas no fluido gengival foram realizadas utilizando um analisador Luminex 200 (Alameda, CA, EUA) com kits Milliplex (Millipore, Billerica, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Cinquenta µL de fluido gengival foram usados para analisar os níveis de IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, interferon (IFN) -γ, osteocalcina (OC), osteoprotegerina (OPG) e RANK-L. Resumidamente, microesferas revestidas com anticorpos monoclonais foram adicionados seguindo-se a incubação de amostras e os padrões durante a noite a 4°C. Os anticorpos secundários foram incubados durante 1 h, seguido por 30 min de incubação com conjugado de estreptavidina R-ficoeritrina. Após lavagem exaustiva, foi adicionado fluido de revestimento, e as microesferas foram analisadas num analisador de microesferas. As concentrações das citocinas nas amostras de fluido gengival analisadas foram calculadas a partir da curva padrão por software Analyst Milliplex (Milliplex, Billerica, MA, EUA), e os níveis expressos em pg / mL. (Manuscrito III)

2.7 Intervenção com ômega-3 e procedimentos do estudo

Pacientes com periodontite foram randomizados usando um sorteio para a suplementação de quatro meses com ω-3 ou placebo. Todos os pacientes receberam tratamento periodontal não-cirúrgico que consistiu de instruções de higiene oral, raspagem

supra e subgingival e alisamento radicular (RAR), sob anestesia local. O tratamento foi realizado por um periodontista experiente (GLM), com instrumentos manuais (Gracey e curetas McCall, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) e ultrassônico (Cavitron selecionar, Dentsply, York, PA, EUA). Em média, o tratamento exigido foi de quatro sessões de 50 minutos. O grupo de intervenção recebeu suplemento dietético ω -3 (3 cápsulas de 300 mg ω -3; 180 mg de EPA / 120 mg de DHA / dia), e o grupo controle recebeu placebo (três cápsulas de 450 mg de gelatina / dia) (Quintaessencia, Rio de Janeiro, Brasil). Os pacientes de ambos os grupos receberam três recipientes com 30 cápsulas / mês. A adesão foi avaliada pelo retorno de embalagens vazias, e avaliadas semanalmente em visitas à clínica ou por chamadas telefônicas. Os códigos não foram decodificados até que as avaliações de acompanhamento e análises tenham sido realizadas para assegurar um protocolo adequado estudo duplo-cego. (Artigo / Manuscrito II; III)

2.8 Manuseio dos dados e análise estatística

Os dados categóricos sobre gênero e raça foram testados utilizando o teste exato de Fisher, e tabagismo e estado metabólico testados utilizando o teste do qui-quadrado de Pearson. Diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste t de Student não pareado ou Mann-Whitney U ou Análise de variância de apenas uma variância (ANOVA), e dentro dos grupos, quando se comparam diferentes sítios e antes e depois da terapia / intervenção, utilizando Wilcoxon Signed Rank Test. As médias foram padronizadas para possíveis fatores de confusão quando apropriado, descritos nas notas de rodapé das tabelas e figuras usando o procedimento de modelo linear geral (GLM), com análise de covariância (ANCOVA) e Bonferroni. Os coeficientes de correlação de Spearman foram calculados entre os parâmetros clínicos periodontais, e os níveis de marcadores inflamatórios no soro e no fluido gengival. Para as análises SPSS (versão 19.0; IBM Corporation, Armonk, Nova Iorque, EUA) foi utilizado. Os dados apresentados como médias e desvio padrão (DP). Os níveis de significância foram definidos para $p \leq 0,05$ (*), 0,01 (**), ou 0,001 (***). (Artigos / Manuscrito I; II; III)

3 RESULTADOS

3.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes com gengivite e periodontite

As características dos pacientes com periodontite e gengivite são apresentadas na Tabela 1. Não houve diferença na proporção de gênero ou raça entre os grupos, mas os pacientes com periodontite foram aproximadamente 15 anos mais velhos e tendem a ter uma maior proporção de fumantes (ex-fumantes). Os pacientes com periodontite tinham significativamente menor número de dentes próprios e maior número de dentes com interproximal apresentando PBS ≥ 5 mm e NIC ≥ 3 mm. O IP foi significativamente maior no grupo periodontite, ao passo que a proporção de superfícies com SS foi semelhante entre os grupos.

Tabela 1- Características clínicas e demográficas dos pacientes com gengivite e periodontite.

	Gengivite (N=16)	Periodontite (N=21)	P valor
*Idade, média \pm DP	31,6 \pm 7,3	46,0 \pm 9,0	<0,001
†Gênero, % homem / mulher	20/80	35/65	0,458
†Raça, % não-branco/branco	73/27	45/55	0,167
¶Fumante/nunca fumante, %	0/100	30/70	0,066
*Número de dentes, média \pm DP (amplitude)	26,7 \pm 1,3 (4)	23,4 \pm 3,4 (12)	0,003
Número de dentes com interproximal PBS ≥ 5 mm and NIC ≥ 3 mm, média \pm DP (amplitude)	0	10,9 \pm 5,4 (17)	
*PBS, média \pm DP	1,3 \pm 0,5	3,2 \pm 0,5	<0,001
*NIC, média \pm DP	0,2 \pm 0,1	1,9 \pm 0,7	<0,001
*SS %, média \pm DP	15,1 \pm 12,0	18,8 \pm 17,0	0,842
*IP %, média \pm DP	28,4 \pm 18,8	60,2 \pm 24,8	<0,001

Legenda: PBS, profundidade de bolsa à sondagem total (mm); NIC, nível de inserção clínico total (mm); SS, sangramento à sondagem (%); IP, índice de placa O'Leary's (%).

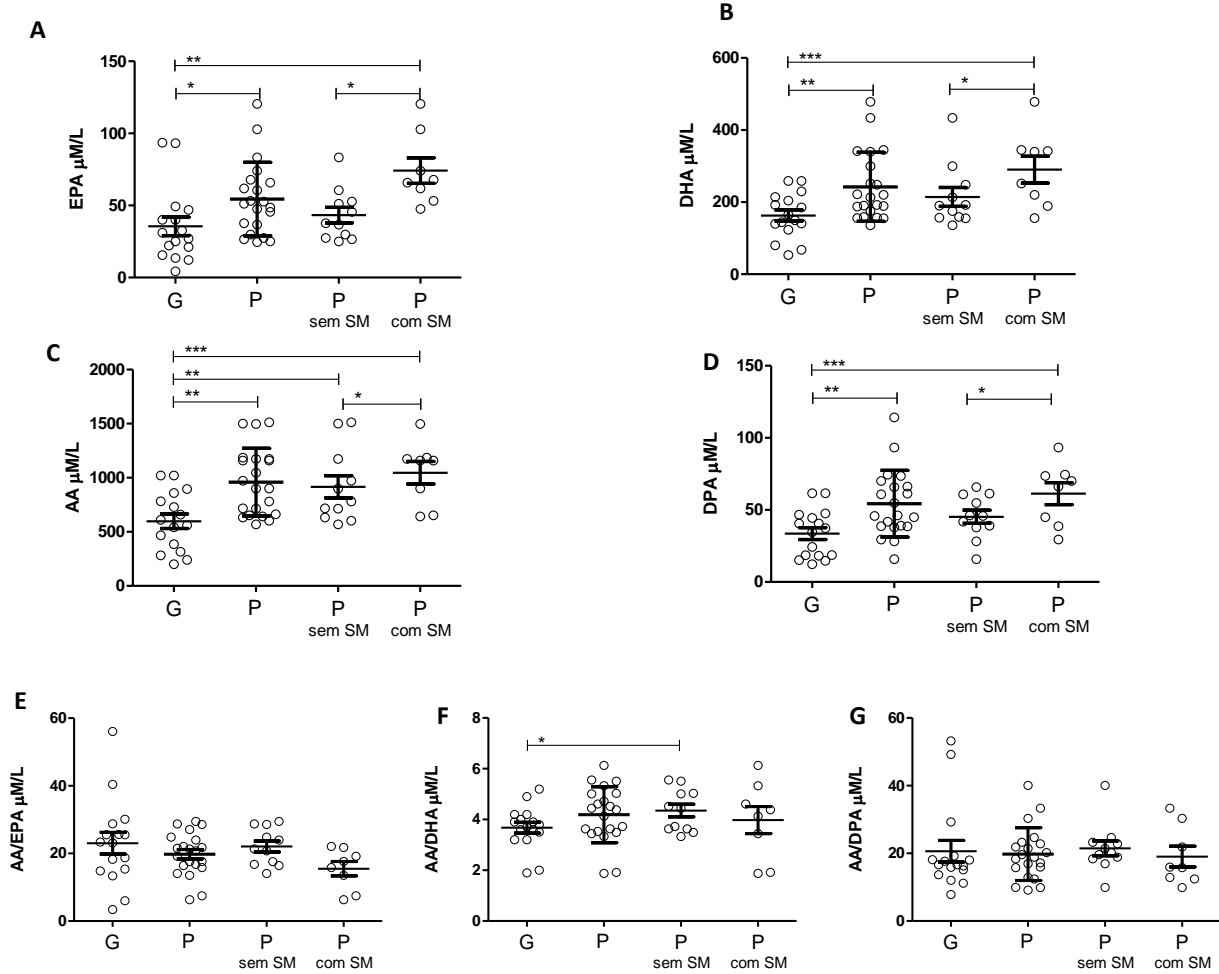
Nota: *Comparado usando Mann-Whitney, e quando avaliados pelo Modelo linear geral (GLM) com análise de covariância (ANCOVA) ajustado para fumo, idade e gênero não apresentaram diferente significância. †Comparado usando teste exato de Fisher. ¶Comparado usando teste de Pearson qui-quadrado.

3.2 Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa e parâmetros sanguíneos biológicos dos pacientes com gengivite e periodontite

Os níveis séricos significativamente mais elevados para DHA, DPA, EPA e AA foram observados em pacientes com periodontite em comparação com gengivite ($p = 0,007$, $0,004$, $0,033$ e $0,001$, respectivamente). As diferenças foram ainda significativas, mesmo após os ajustes para idade e sexo. Os pacientes com periodontite e com síndrome metabólica apresentavam níveis de DHA, DPA e EPA significativamente mais elevados quando comparados com periodontite e sem síndrome metabólica, e níveis significativamente mais elevados de AA, DHA, DPA e EPA em comparação com pacientes com gengivite. AA é significativamente maior em pacientes com periodontite sem síndrome metabólica em comparação com gengivite (Figuras 2A-D). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para as razões de AA / EPA, AA / DHA e AA / DPA. A razão AA / DHA foi significativamente maior em pacientes com periodontite sem síndrome metabólica em comparação com pacientes com gengivite (Figuras 2E-G).

Os níveis de hemoglobina glicosilada e glicose foram maiores em pacientes com periodontite comparado com gengivite ($p = 0,025$ e $0,018$, respectivamente). Após o ajuste para idade e sexo, a diferença manteve-se significativa para a hemoglobina glicada ($p = 0,003$), a diferença nos níveis de glicose desapareceu e os níveis de triglicerídeos tornaram-se significativamente mais elevados nos pacientes com periodontite ($p = 0,039$). Para todos os outros parâmetros analisados nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos (Tabela 2).

Figura 2 - AGPI-CLs séricos nos pacientes com gengivite e periodontite.



Legenda: A-D Os níveis séricos de DHA, EPA, DPA, e AA; e das E-G razões AA/EPA, AA/DHA e AA/DPA apresentados por valores da média \pm DP ($\mu\text{M/L}$) dos pacientes com gengivite (G; n=16), periodontite (P; n=21) e subgrupo de pacientes com periodontite sem (n=8) e com (n=11) síndrome metabólica (SM).

Nota: Dois pacientes não puderam ser classificados segunda a síndrome metabólica pois não apresentavam todas os dados necessários, e referente aos pacientes com gengivite, estes não apresentavam síndrome metabólica. Dados foram comparados usando t-teste Student não pareado, e Modelo linear geral (GLM) com análise de covariância (ANCOVA) ajustado para idade e gênero, sem diferença de significância entre ambos os testes realizados. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$

Tabela 2- Valores médios \pm DP e mediana (amplitude) para o índice bioquímico dos pacientes com gengivite e periodontite.

Variáveis	Gengivite	Periodontite	P valor	‡ ANCOVA
† Triglicérideo (mg/dl)	82.1 \pm 34.8	107.2 \pm 55.1	0.120	0.039
† Colesterol (mg/dl)	190.62 \pm 40.2	199.1 \pm 35.0	0.459	0.199
* HDL Colesterol (mg/dl)	49.5 (54.0)	44.0 (64.0)	0.078	0.181
† LDL Colesterol (mg/dl)	118.5 \pm 29.7	130.8 \pm 31.6	0.236	0.162
* VLDL Colesterol (mg/dl)	14.5 (121.0)	17.0 (39.0)	0.280	0.440
* hsCRP (mg/dl)	0.2 (4.1)	0.1 (1.4)	0.639	0.495
† Leucócitos (/mm ³)	7828.8 \pm 2682.2	6330.0 \pm 2017.5	0.095	0.115
† Hemoglobina Glicada (%HbA1c)	5.2 \pm 0.2	5.5 \pm 0.3	0.025	0.003
† Insulina (mcUI/ml)	7.9 \pm 5.9	5.0 \pm 0.3	0.092	0.163
† Glicose (mg/dl)	91.6 \pm 8.5	98.9 \pm 9.1	0.018	0.107

Nota: * Comparado usando Mann Whitney; † t-teste Student não pareado; ‡ Modelo linear geral (GLM) com análise de covariância (ANCOVA) ajustado para idade e gênero.

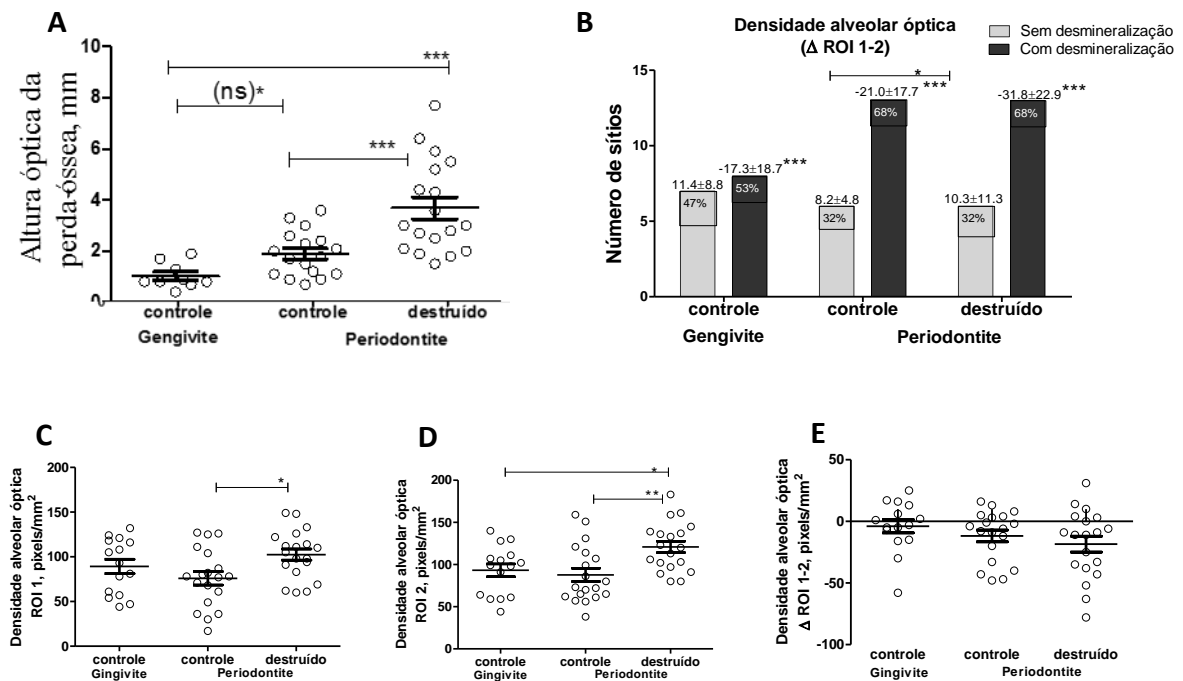
3.3 Características clínicas e ópticas dos sítios controle-gengivite, controle-periodontite e destruído

Foram avaliadas as características clínicas e ópticas periodontais dos sítios controle em pacientes com gengivite e sítios controle-periodontites e destruído em pacientes com periodontite. Não houve diferença na PBS e NIC entre os sítios gengivite-controle ($2,4 \pm 0,6$; $0,3 \pm 0,5$) e sítios controle-periodontite ($2,6 \pm 0,5$; $0,6 \pm 0,5$), enquanto a PBS e o NIC dos sítios destruídos ($6,1 \pm 1,3$; $4,8 \pm 1,6$, respectivamente) foram significativamente aumentados em comparação com sítios controle-gengivite e controle-periodontite ($p \leq 0.001$, para ambos) (dados não apresentados). A altura óptica da perda óssea alveolar foi maior em sítios destruídos em relação aos sítios controle-gengivite e controle-periodontite, e havia uma tendência de aumento da altura nos sítios controle-periodontite em relação aos sítios controle-gengivite. No entanto, quanto ao ajuste para fumo, idade e gênero, este não fez atingiram

significância estatística (Figura 3A). A PBS e o NIC foram correlacionados positivamente ($p \leq 0.001$; $r = 0,9$) e a altura óptica da perda óssea alveolar foi positivamente correlacionada com a PBS e o NIC ($p \leq 0.001$; $r = 0,7$) (dados não apresentados).

Os sítios foram subagrupados em sítios sem e com considerável desmineralização óptica presumida. Sítios com desmineralização ópticas (barras pretas, Figura 3B) foram observados em sítios controle dos pacientes com gengivite (53%), sítios controle-periodontite (68%) e destruído (68%) em pacientes com periodontite. A densidade óptica alveolar média dos sítios desmineralizado (valores acima de barras, a Figura 3B) foram significativamente inferiores em comparação com os sítios sem desmineralização em todos os grupos ($p \leq 0.001$). A densidade óptica alveolar média em sítios sem desmineralização (barras cinza, Figura 3B) foi maior em sítios destruídos em comparação com sítios controle-periodontites ($p \leq 0,05$).

Figura 3 - Dados ópticos periodontais dos participantes do estudo.



Legenda: A- A altura óptica da perda da crista óssea alveolar em sítios controle-gingivite e sítios controle-periodontites e destruídos de pacientes com periodontite e B- o número e a porcentagem de sítios com e sem considerável desmineralização alveolar óptica presumida pela Δ densidade alveolar óptica na região de interesse (ROI) 1-2 e valores médios de densidade alveolar óptica desses subgrupos de sítios (com e sem desmineralização) (acima das barras). C- Densidade óptica alveolar em ROI 1 D- densidade óptica alveolar em ROI 2 E- Δ densidade óptica alveolar em ROI 1-2 em sítios controle-gingivite e sítios controle-periodontites e destruídos de pacientes com periodontite.

Nota: Comparação entre os sítios controle-gingivite, controle-periodontite e destruídos de pacientes com periodontite (Mann-Whitney Test), e processo de modelo linear geral (GLM), com análise de covariância (ANCOVA) e Bonferroni ajustado para fumo, idade e gênero apresentada entre parênteses quando difere do resultado realizado pelo teste prévio, e entre sítios controle-periodontite e destruídos de pacientes com periodontite (Wilcoxon W). ns: não significativos; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

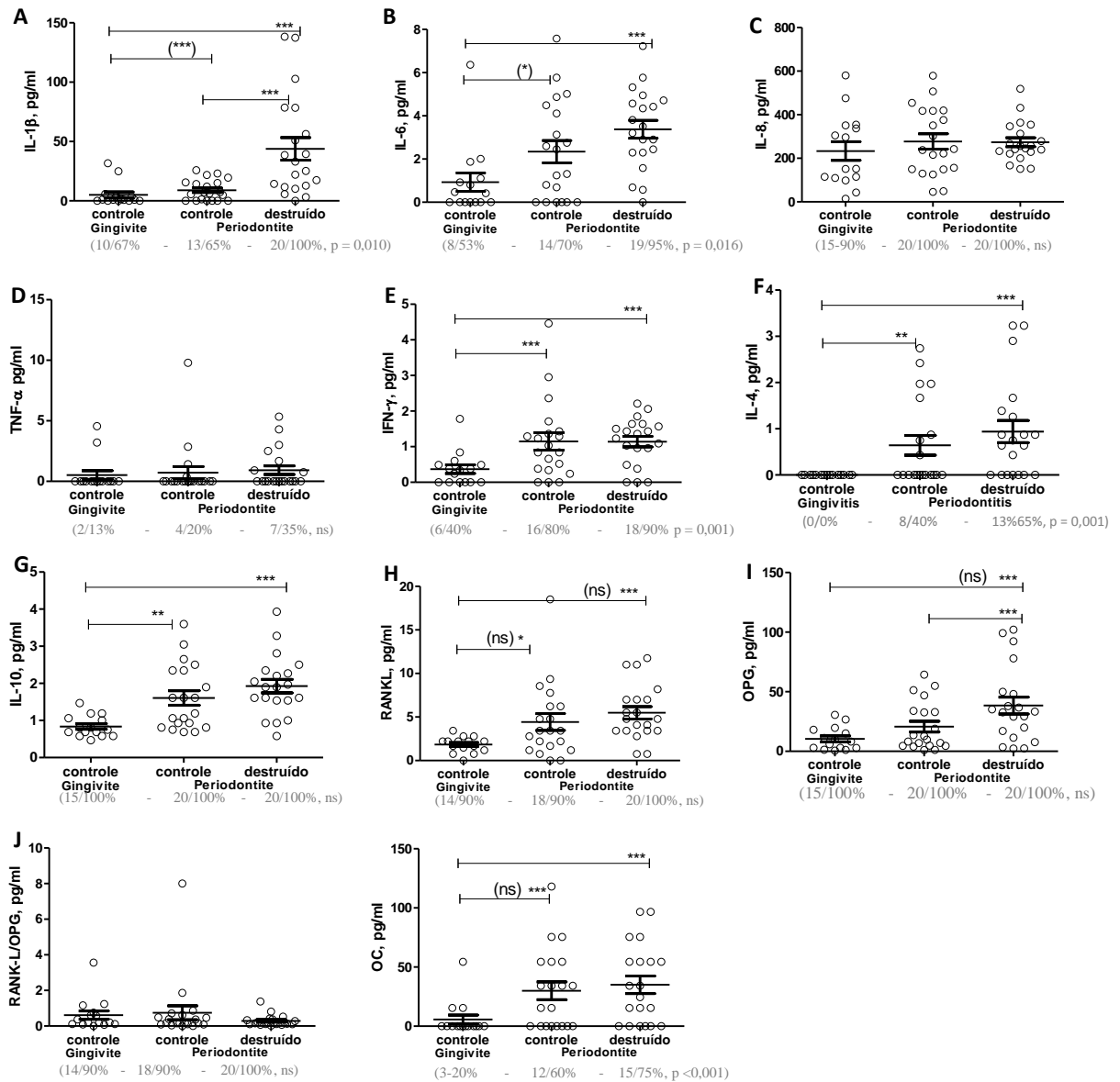
3.4 Citocinas no fluido gengival dos sítios controle-gengivite, controle-periodontite e destruído

Foram analisados os níveis dos marcadores inflamatórios no fluido gengival e relacionados a densidade óptica do osso alveolar dos sítios correspondentes, agrupados em sítios controle-gengivite e sítios controle-periodontite e destruídos em pacientes com periodontite. As citocinas, IL-8, IL-10, RANK-L e OPG, foram medidas em 90-100% de todos os sítios enquanto que a frequência de detecção de IL-1 β (67-65-100%, $p = 0,010$), IL-6 (53- 70-95%, $p = 0,016$), IFN- γ (40-80-90%, $p = 0,001$), OC (20-60-75%, $p < 0,001$), TNF- α (13-20-35%, $p = 0,292$), e IL-4 (0-40-65%, $p = 0,001$) diferiu entre sítios controle-gengivite e sítios controle-periodontite e destruídos de pacientes com periodontite (respectivamente -%)

Os níveis das citocinas no fluido gengival dos sítios controle-gengivite foram menores para IFN- γ , IL-4, IL-10, RANK-L e OC em comparação com sítios controle-periodontite e sítios destruídos (Figuras 4E, F, G, H, K), e para IL -1 β , IL-6 e OPG em comparação com sítios destruídos (Figuras 4A, B, D). Quando ajustados para idade e gênero, o nível de RANK-L nos sítios controle-gengivite em comparação com sítios controle-periodontites e destruídos, o nível de OC comparado a sites controle-periodontite, e de OPG em comparação com sítios destruídos não alcançaram significância estatística (Figuras 4H, K, I, entre parênteses). As citocinas, IL-1 β e IL-6, foram significativamente menores em sítios controle-gengivite em comparação com sítios controle-periodontite após o ajuste (Figuras 4A, B, entre parênteses). Não houve diferenças significativas para os níveis de IL-8, TNF- α ou RANK-L / OPG entre os sítios controle gengivite, controle-periodontite e destruídos (Figura 4C, D, J), enquanto que pacientes com periodontite apresentaram menores níveis de IL-1 β e OPG nos sítios controle-periodontite em comparação aos sítios destruídos (Figuras 4A, I).

A PBS e o NIC foram positivamente correlacionados com OPG ($p = 0,01$, $r = 0,3$), OC ($p = 0,01$, $r = 0,4$; e $p = 0,02$, $r = 0,4$, respectivamente), IFN- γ ($p = 0,02$, $r = 0,3$; e $p = 0,03$, $r = 0,3$, respectivamente), IL-10 ($p = 0,002$, $r = 0,4$; $p = 0,003$ e $r = 0,4$, respectivamente), IL-1 β ($p < 0,001$, $r = 0,7$), IL-4 ($p = 0,01$, $r = 0,4$) e IL-6 ($p = 0,001$, $r = 0,4$). O nível de RANK-L foi positivamente correlacionado com o NIC ($p = 0,05$, $r = 0,3$), e os níveis de OC e IL-1 β à altura óptica da perda da crista óssea alveolar ($p \leq 0,001$, $r = 0,6$) em todos os indivíduos (dados não mostrados).

Figura 4 - Nível de citocinas no fluido gengival dos sítios controle-gengivite e controle-periodontite e destruídos dos pacientes com periodontite.



Legenda: A-K O nível das citocinas, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, RANK-L, OPG, RANK-L/OPG e OC, no fluido gengival de sítios controle-gengivite e controle-periodontite e destruídos dos pacientes com periodontite.

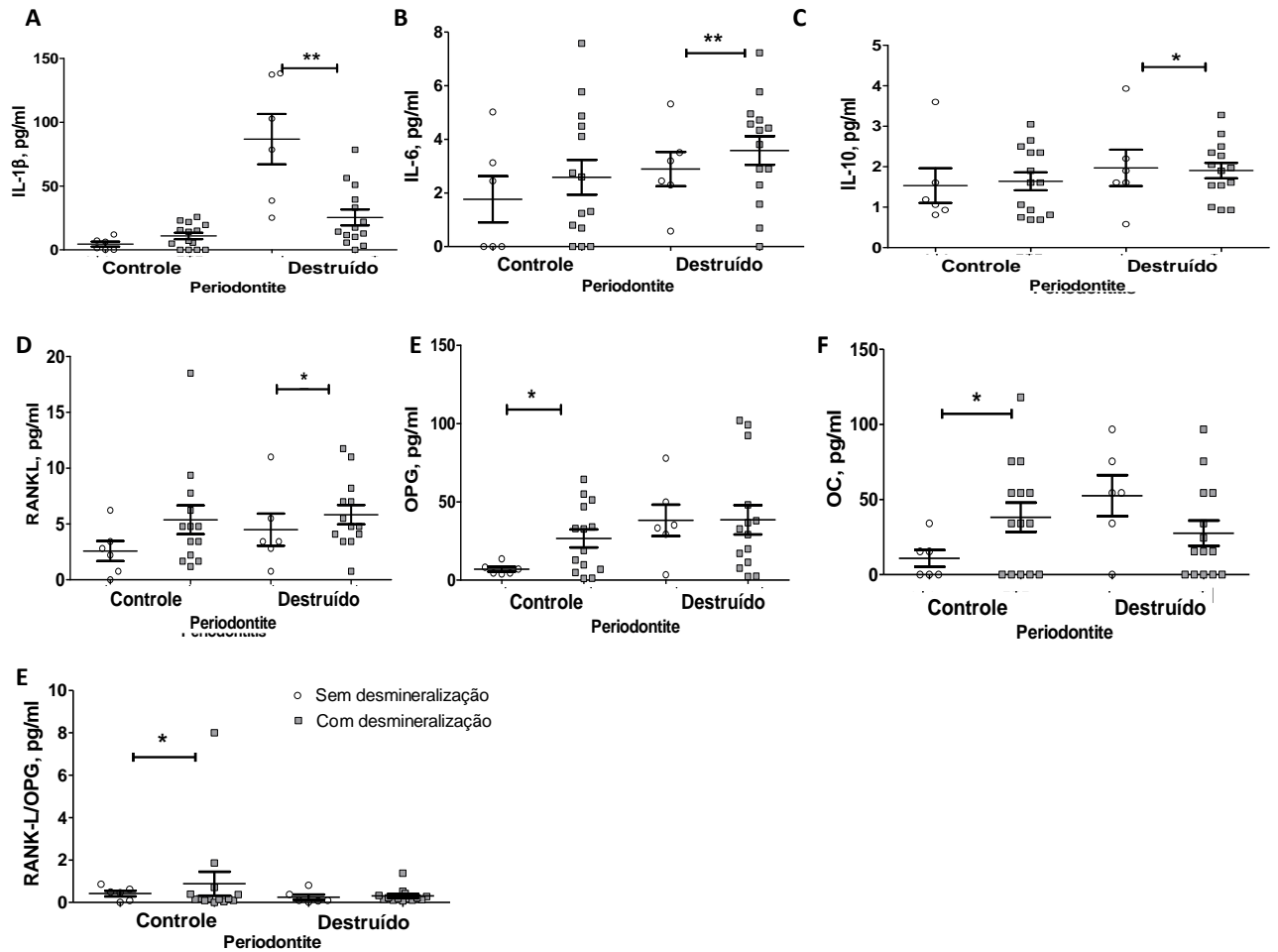
Nota: O número e a percentagem de sítios mensuráveis, respectivamente, em cada grupo são apresentados entre parênteses abaixo de cada gráfico, comparados por Análise de Variância de apenas uma variância (ANOVA). Comparação entre os sítios controle-gengivite e sítios controle-periodontite e destruídos dos pacientes com periodontite (Mann-Whitney Test), e modelo linear geral (GLM) com análise de covariância (ANCOVA) e Bonferroni ajustado para fumo, idade e gênero apresentado entre parênteses quando o valor de significância difere do teste prévio. ns: não significativos; *p \leq 0.05; **p \leq 0.01; ***p \leq 0.001.

3.5 Citocinas no fluido gengival dos sítios com e sem desmineralização óptica controle-periodontite e destruído

Para avaliar a relação entre as citocinas no fluido gengival e a densidade óptica foram analisados os subgrupos de sítios com e sem considerável desmineralização óptica presumida. Os sítios destruídos com desmineralização tinham nível de RANK-L, IL-6 e IL-10 significativamente mais elevados (Figuras 5D, B, C), e nível de IL-1 β menor (Figure 5A) comparados aos sítios sem desmineralização. Os sítios controle-periodontite com desmineralização apresentaram níveis significativamente maiores para OPG, OC e a razão de RANK-L / OPG em comparação com sítios sem desmineralização (Figuras 5E, F, G).

A densidade óptica alveolar foi negativamente correlacionada com PBS ($p = 0,04$, $r = -0,6$), OPG ($p = 0,01$, $r = -0,4$), IL-6 ($p = 0,03$, $r = -0,4$) e TNF- α ($p = 0,03$, $r = -0,4$) em sítios considerados desmineralizados. Não houve diferenças para as outras citocinas analisadas entre os sítios com e sem presumida desmineralização óptica de pacientes com periodontite e não houve diferenças em qualquer uma das citocinas analisadas entre os estes sítios em pacientes com gengivite (dados não apresentados).

Figura 5 - Níveis de citocinas no fluido gengival dos sítios com e sem considerável desmineralização óptica dos grupos controle-periodontite e destruído dos pacientes com periodontite.



Legenda: A-G As citocinas, RANK-L, IL-1β, IL-6, IL-10, OPG, OC e RANK-L/OPG, são apresentadas nos subgrupos, com e sem considerável desmineralização ópticas, dos sítios controle-periodontite e destruído dos pacientes com periodontite.

Nota: Comparação entre as áreas com e sem desmineralização de pacientes com periodontite (Mann-Whitney Test). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

3.6 Características clínicas e óptica dos pacientes com periodontite dos grupos de intervenção

Para avaliar o impacto da ω -3 suplementação na saúde periodontal os pacientes com periodontite foram randomizados em grupos com suplementação com ω -3 ou placebo combinado com tratamento periodontal não-cirúrgico, seguido de medições clínicas e óptica periodontais, após 4 meses. Os dados demográficos indicaram que ambos os grupos, RAR + ω -3 e RAR + placebo, foram semelhantes em relação à idade, gênero, tabagismo, raça e IMC (Tabela 3). A média do IMC foi de 28,2 (\pm 2,8) e 28,3 (\pm 4,2) kg / m² nos grupos RAR + ω -3 e RAR + placebo, respectivamente. Todos os participantes estavam acima do peso, com exceção de um paciente em RAR + ω -3 (IMC 23,6 kg / m²), e dois pacientes no grupo RAR + placebo (IMC 20,6 e 31,4 kg / m²). Quatro pacientes do grupo RAR + ω -3 apresentavam síndrome metabólica, quatro não apresentavam e dois não puderam ser avaliados. No grupo RAR + placebo, sete pacientes foram diagnosticados com síndrome metabólica enquanto os outros 4 pacientes não apresentaram a síndrome. O questionário de frequência alimentar mostrou que o consumo estimado de ω -3 AGPI-CL foi inferior a 250 mg / dia (DHA + EPA) recomendado pela FAO / OMS para ambos os grupos, antes do estudo. Por conseguinte, os grupos foram considerados como homogêneos em relação à ingestão habitual de ω -3 AGPI-CL (dados não apresentados). No início do estudo após a randomização, não houve diferenças na PBS, NIC, SS ou IP entre os dois grupos experimentais. Após o tratamento, a PBS, o NIC, e SS melhoraram significativamente em ambos os grupos, no entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os pacientes que receberam ω -3 ou placebo (Tabela 3).

Tabela 3- Características clínicas e demográficas dos pacientes dos grupos de intervenção.

		Periodontite RAR+ ω -3 (N=10)	Periodontite RAR+placebo (N=11)
*Idade, média \pm DP		44,4 \pm 6,4	47,9 \pm 1,11
†Gênero, homem/mulher		3/7	4/7
†Raça, não-branca/branca		5/5	4/7
¶Fumante/nunca fumante,		2/8	4/7
*PBS	Inicial	3,4 \pm 0,5	3,1 \pm 0,5
	4ºmês	**2,4 \pm 0,3	**2,2 \pm 0,3
*NIC	Inicial	2,0 \pm 0,8	1,9 \pm 0,6
	4ºmês	**1,4 \pm 0,9	**1,3 \pm 0,8
*SS %	Inicial	23,4 \pm 20,8	15,0 \pm 11,2
	4ºmês	*8,4 \pm 9,1	6,2 \pm 4,9
*IP %	Inicial	61,6 \pm 27,3	56,7 \pm 23,3
	4ºmês	49,8 \pm 15,2	47,8 \pm 24,9

Legenda: PBS, profundidade de bolsa à sondagem total (mm); NIC, nível de inserção clínico total (mm); SS, sangramento à sondagem (%); PI, índice de placa O'Leary's (%).

Nota: Não foram encontradas diferenças entre os grupos RAR+ ω -3 e RAR+placebo usando Teste de Mann-Whitney (*), teste exato de Fisher (†) e teste Pearson qui-quadrado (¶).

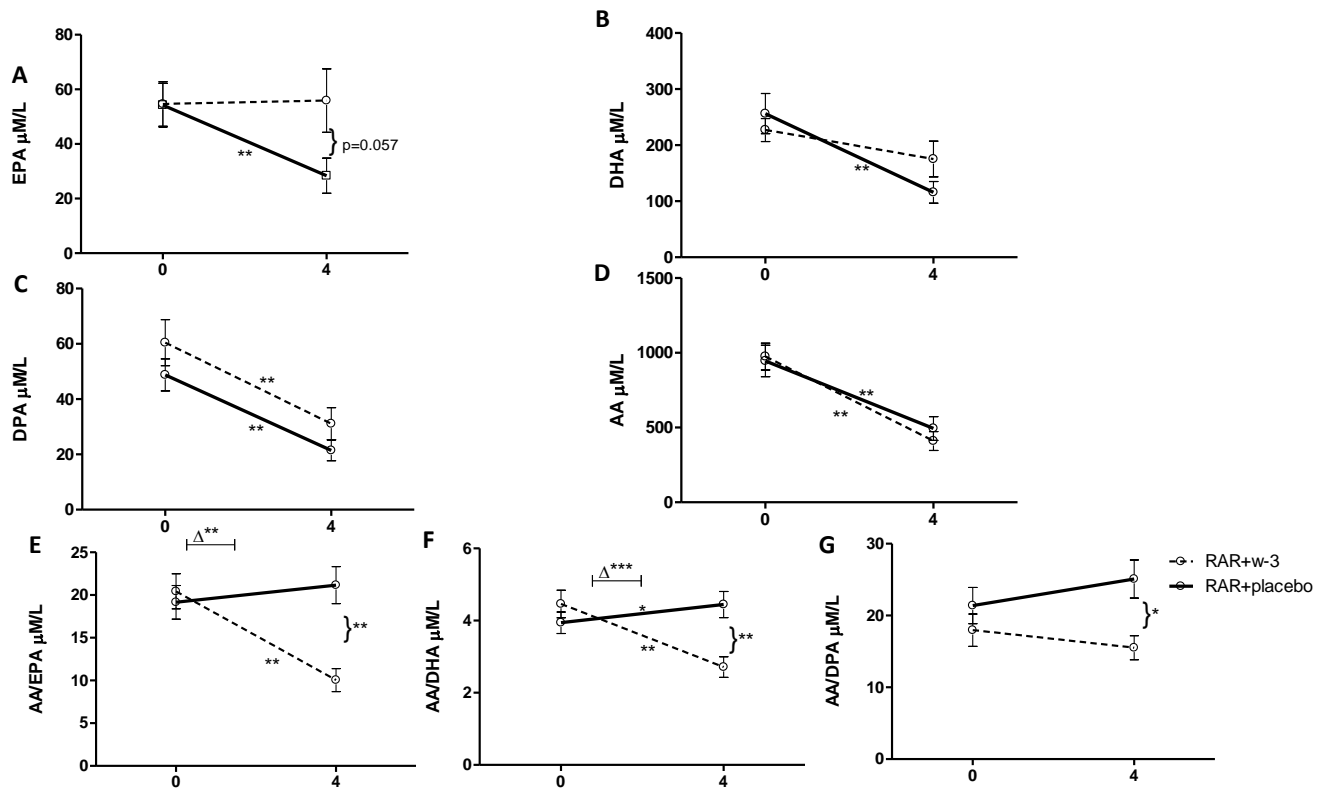
Comparação antes (inicial) e após terapia (4º mês) usando Teste de Wilcoxon Signed Ranks. *p \leq 0.05; **p \leq 0.01; ***P \leq 0.001.

3.7 Mudanças dos níveis séricos dos AGPI-CL dos pacientes com periodontite dos grupos de intervenção

No início do estudo e após o tratamento periodontal, os grupos RAR + ω -3 e RAR + placebo não mostraram nenhuma diferença significativa nos níveis séricos de DHA, DPA, EPA e AA. Após o tratamento periodontal, no entanto, o grupo RAR + placebo mostrou uma redução significativa para os níveis séricos de DHA, DPA, EPA e AA, enquanto que o RAR + ω -3 grupo mostrou uma redução significativa apenas em DPA e AA (Figuras 6A-D). No início do estudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para as razões AA / EPA, AA / DHA e AA / DPA, ao passo que após o tratamento, todas as proporções analisadas no RAR + ω -3 grupo foram significativamente menores em comparação com o grupo RAR + placebo. O grupo RAR + placebo não mostraram diferenças nas razões AA / EPA e AA / DPA aos 4 meses em comparação ao início, mas a razão AA /

DHA aumentou significativamente. O grupo RAR + ω -3 mostrou uma redução significativa nas razões AA / EPA e AA / DHA. A diferença (Δ) para as razões AA / EPA e AA / DHA foi significativamente maior no grupo RAR + ω -3 em comparação com o grupo RAR + placebo (Figuras 6E-G).

Figura 6 - Níveis séricos dos AGPI-CLs dos grupos de intervenção.



Legenda: A-D Os níveis séricos de DHA, EPA, DPA, e AA; e das E-G proporção de AA / EPA, AA / DHA e AA / DPA média - Erro (μ M/L) de pacientes com periodontite no início (0) e 4 meses após RAR + ω -3 contra RAR + placebo.

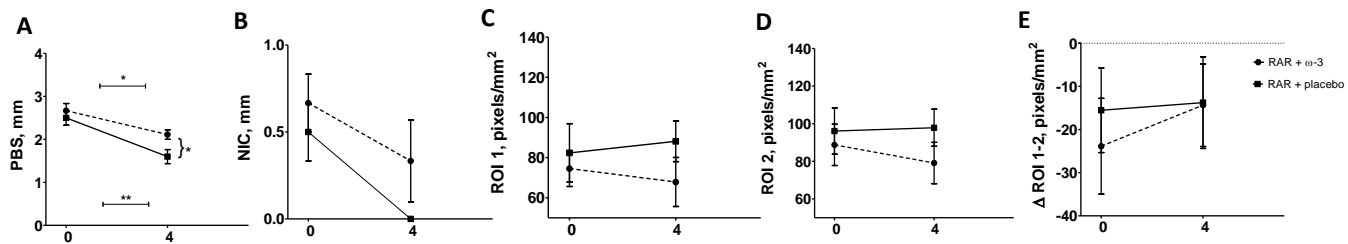
Nota: Comparação entre RAR + ω -3 e RAR + placebo (Mann-Whitney), é indicado verticalmente, a comparação entre o início (0) e 4 meses (Wilcoxon W) é indicada acima da linha horizontal. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

3.8 Mudanças clínicas e óptica dos sítios controle-periodontite e destruído dos pacientes com periodontite dos grupos de intervenção

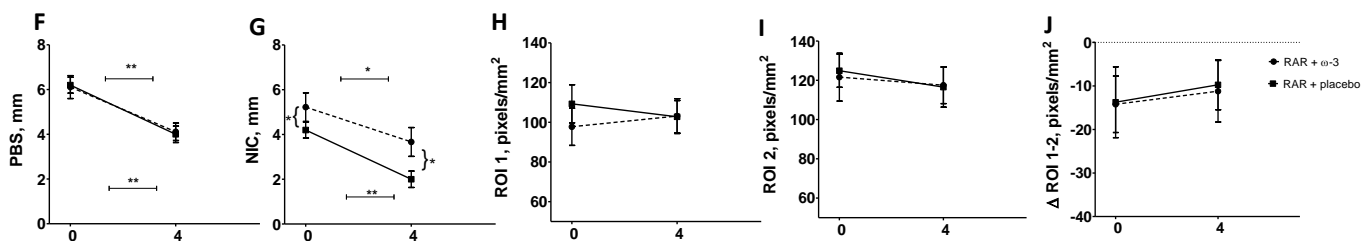
Foram analisadas alterações clínicas e óptica dos sítios controle-periodontite e destruído nos grupos de intervenção. No início do estudo, não foram observadas diferenças na PBS dos sítios controle-periodontite e destruído entre os grupos RAR + ω -3 e RAR + placebo. Após o tratamento, a PBS melhorou significativamente em sítios controle-periodontite e destruído de ambos os grupos em relação ao período inicial, sem diferenças significativas entre os pacientes que receberam RAR + ω -3 ou RAR + placebo (Figuras 7A, D). O NIC no período inicial foi maior nos sítios destruídos do grupo RAR + ω -3 (Figura 7E). Após o tratamento, o NIC melhorou nos sítios destruídos de ambos os grupos em comparação aos valores do período inicial (Figura 7B). E permaneceu mais elevado em sítios destruídos do grupo RAR + ω -3 em comparação com o grupo RAR + placebo (Figura 7E). Não há alterações na densidade óptica alveolar dos sítios controle-periodontite ou destruído após o tratamento em ambos os grupos experimentais (Figuras 7C, F). Alterações clínicas dos sítios controle-periodontite e destruído não melhoraram por qualquer adição de suplementação com ω -3 ou placebo ao tratamento periodontal não-cirúrgico.

Figura 7 - Dados clínicos e ópticos periodontais dos grupos de intervenção.

Sítios controle-periodontite



Sítios destruídos



Legenda: A-C Os parâmetros periodontais profundidade de bolsa à sondagem (PBS), nível de inserção clínico (NIC), a densidade óptica alveolar na região de interesse (ROI) Δ 1-2 em sítios controle-periodontite e destruído de pacientes com periodontite no início (0) e aos 4 meses seguintes nos grupos RAR + ω-3 e RAR + placebo.

Nota: A comparação entre RAR + ω-3 e RAR + placebo (Mann-Whitney) é indicada verticalmente, a comparação entre os valores iniciais (0) e 4 meses (Wilcoxon W) é indicada acima da linha horizontal.

3.9 Mudanças do nível de citocinas no fluido gengival dos sítios controle-periodontite e destruído dos pacientes com periodontite dos grupos de intervenção

Foram avaliados o impacto do tratamento periodontal não-cirúrgico com e sem suplementação com ω-3 nos níveis das citocinas no fluido gengival. As citocinas, IL-8, IL-10, RANK-L e OPG, foram mensuráveis em 90-100% dos sítios controle-periodontite e destruído de pacientes com periodontite no período inicial e após o tratamento. Em sítios controle-periodontite, no período inicial, os níveis das citocinas, IL-8 e TNF-α, foram maiores no grupo RAR + placebo em comparação com RAR + ω-3 (Figuras 8C, D). O tratamento resultou em um aumento nos níveis da IL-4 e em decréscimo nos níveis da OC no grupo RAR + ω-3 (Figuras 8F, J), além de uma diminuição no nível da IL-6 de ambos os grupos (Figura 8B), e uma diminuição na produção de IL-8 no grupo RAR + placebo (Figura 8C). A

percentagem de sítios mensuráveis após o tratamento reduziu para as citocinas OC em 40-20%, IFN- γ 20%, IL-6 70-60%, e aumentou para IL-4 em 30-10% nos grupos RAR + ω -3 e RAR + placebo, respectivamente. A percentagem de sítios mensuráveis reduziu para IL-1 β em 30% no grupo RAR + ω -3, e aumentou em 10% no grupo RAR + placebo. E a percentagem de sítios mensuráveis para TNF- α elevou em 20% no grupo RAR + ω -3 e reduziu em 10% em RAR + placebo.

Após o tratamento, em sítios destruídos, enquanto o nível da IL-4 aumentou significativamente, os níveis de INF- γ e IL-10 diminuíram significativamente no grupo RAR + ω -3 (Figuras 8F, E, G), e o nível das citocinas, IL-1 β , IL-8, IL-6 e OPG, diminuíram significativamente em ambos os grupos (Figuras 8A, C, B, I). O nível de OC reduziu significativamente no grupo RAR + placebo em comparação com RAR + ω -3 (Figura 8J). A redução percentual de sítios mensuráveis para OC foram 50-30%, INF- γ 10-0%, IL-6 40-100%, IL-4 10-0%, IL-1 β 20-30% em RAR + ω -3 e RAR + placebo, respectivamente. A percentagem de sítios mensuráveis para TNF- α aumentou em 10% no grupo RAR + ω -3, e reduziu em 30% no grupo RAR + placebo.

Figura 8 - Níveis de citocinas no fluido gengival dos sítios controle-periodontite e destruídos dos grupos de intervenção. (Continua)

Sítios controle-periodontite

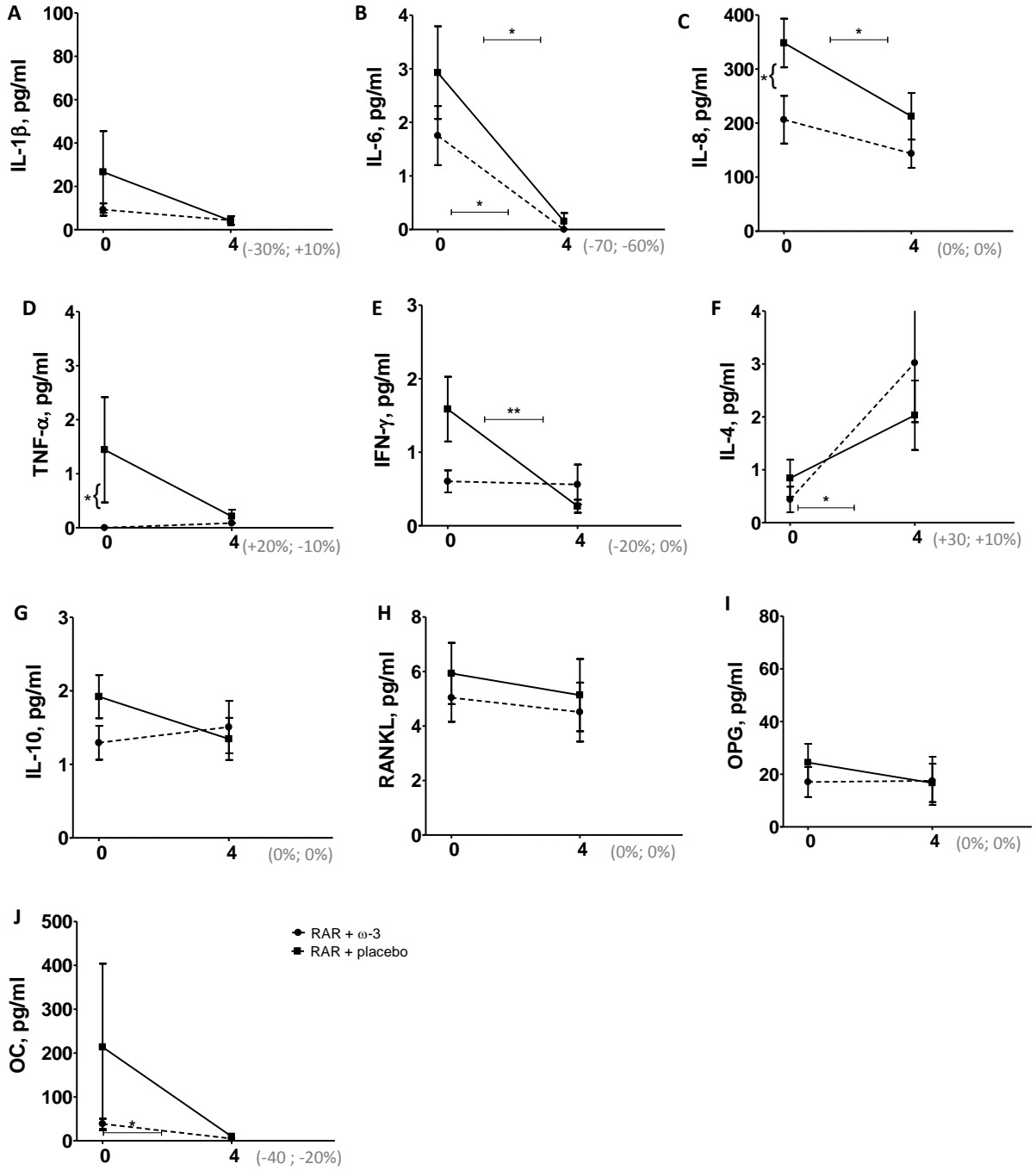
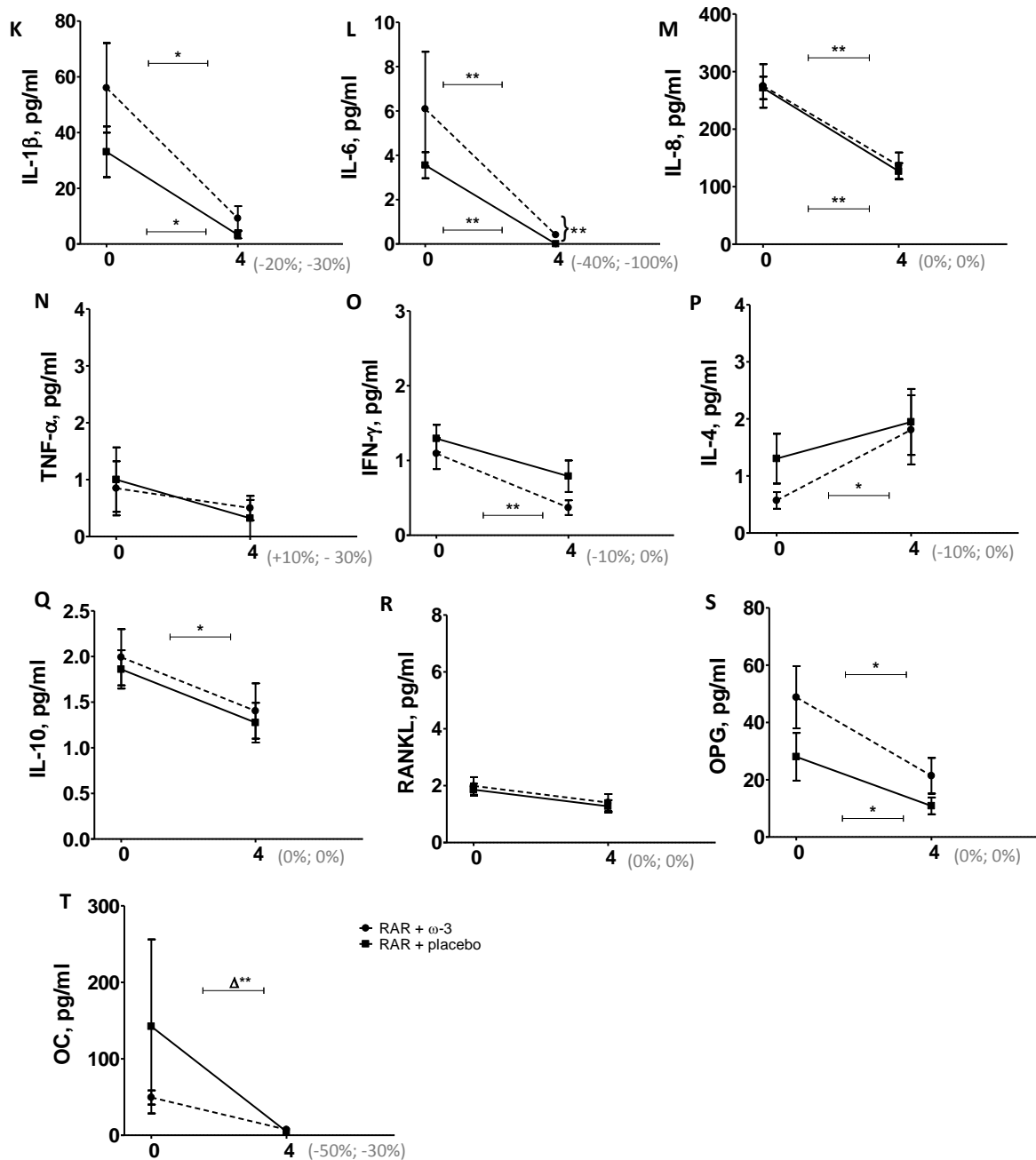


Figura 8 - Níveis de citocinas no fluido gengival dos sítios controle-periodontite e destruídos dos grupos de intervenção. (Conclusão)

Sítios destruídos



Legenda: A-T Os níveis das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, RANKL, OPG e OC no fluido gengival de sítios controle-periodontite e sítios destruídos no período inicial (0) e 4 meses seguintes nos grupos RAR + ω -3 e RAR + placebo.

Nota: A comparação entre RAR + ω -3 e RAR + placebo (Mann-Whitney) é mostrado pela {, a comparação entre os valores iniciais e 4 meses (Wilcoxon W) é apresentada acima da linha horizontal. A redução (-) ou o aumento (+) do percentual de sítios mensuráveis, respectivamente, em RAR + ω -3 e RAR + placebo são apresentados entre parênteses. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

4 DISCUSSÃO

O fato de que a periodontite é sempre precedida por gengivite e apresenta elevada expressão de mediadores inflamatórios sugere que o paciente com periodontite seja portador de reações inflamatórias ou hiper-respostas aberrantes. Os AGPI-CL derivados do ω -3, DHA, EPA e DPA, e derivado do ω -6, AA, envolvidos na modulação da inflamação foram encontrados significativamente mais elevados no soro de pacientes com periodontite não tratados em comparação com gengivite. Nossos resultados relacionados ao AGPI-CL ω -6 (AA) estão em linha com os resultados encontrados por Ramirez-Tortosa et al. (47) e Elabdeen et al. (48), que encontraram níveis de AA significativamente mais elevados em pacientes com periodontite. Requirand et al. (49) também encontraram níveis de AA significativamente mais elevados em pacientes com perda óssea alveolar em comparação com pacientes sem perda óssea alveolar. Estes resultados sugerem que os elevados níveis séricos do AA estão envolvidos na patogênese da periodontite, AGPI-CL ω -6 (AA) modula a intensidade e a duração da resposta inflamatória (50), e perda de osso durante a periodontite experimental. (51)

A maioria das células do sistema imunológico é rica em AA (52), principal fonte de eicosanoides, mediadores lipídicos denominados pró-inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos, e outros denominados pró-resolução, como a lipoxina. (53) Os pontos de controle para a modulação da intensidade e duração da inflamação diferenciada por fases denominadas pró-inflamatória, anti-inflamatória e pró-resolução, por meio da seleção para a produção majoritária de cada grupo de derivados dos AGPI-CL metabolizados a partir de um mesmo substrato ainda não foram definidos. No entanto, é observada uma relação inversa entre a síntese de leucotrienos e lipoxinas por neutrófilos (54), assim como é relatado um aumentado nível de leucotrienos B₄, pró-inflamatórios, e menor nível de lipoxina A₄, pró-resolução, na circulação sanguínea dos pacientes com periodontite agressivas localizadas em comparação com controles saudáveis, sugerindo um desequilíbrio para a produção de mediadores denominados pró-inflamatórios e pró-resolução (55). Além disso, estes neutrófilos não respondem ao tratamento de lipoxina A₄, o que pode contribuir para o estabelecimento da lesão inflamatória crônica e progressão da doença periodontal. (53) O conjunto de dados sugerem a identificação de certos derivados majoritariamente presente em determinada fase do processo inflamatório juntamente a avaliação dos níveis de seus

precursores, o que poderia acrescentar informações relevantes para o estudo dos AGPI-CL na patogênese periodontal.

Os nossos resultados corroboraram com os resultados encontrados por Elabdeen et al. (48) que mostraram níveis elevados de EPA e DHA em pacientes com periodontite agressiva em comparação com os controles saudáveis. Assim como os níveis circulantes de ω -3 estão associados ao maior risco de desenvolver câncer de próstata (56-58). Enquanto que as conclusões sobre o estado de saúde e associação a ingestão do ω -3 apresentam um quadro diferente em comparação com os níveis circulantes destes. Uma meta-análise concluiu que a ingestão de ω -3 não tem uma associação significativa com o desenvolvimento do câncer de próstata (59), ao passo que uma maior ingestão de ω -3 está associada ao menor risco de câncer de próstata fatal (60). Na doença periodontal, os resultados sugerem que a dieta desequilibrada na razão ω -6 / ω -3 AGPI-CL, ou seja, menor ingestão de ω -3, está associada com a doença periodontal (61-63). Uma possibilidade é que um mesmo fator envolvido no risco e gravidade destas doenças mencionadas também está envolvido no metabolismo ou na regulação dos níveis sanguíneos do ω -3 o que provocaria uma alteração nos níveis sanguíneos. Se fosse este o caso, então a associação relatada possivelmente não seria causal, o que não excluiria que um papel protetor ou preventivo do ω -3 para o aparecimento de doenças possa ser sugerido.

Por outro lado, Ramirez-Tortosa et al. (47) não encontraram qualquer diferença significativa para DHA circulante na periodontite em comparação com pacientes controle. E Requirand et al. (49) encontraram níveis significativamente mais baixos de EPA e DHA, em doentes com perda óssea periodontal em comparação com os controles. Esta diferença pode estar relacionada com a ingestão de ω -3 entre os grupos comparados. A ingestão de ácidos graxos é positivamente correlacionada ao nível de ácidos graxos circulantes (64-65). Rizzo et al. (66) e Dawczynski et al. (67) mostraram que a proporção ω -3 / ω -6 circulante pode ser correlacionada com o perfil de dieta independente do estado de saúde. No presente estudo, os pacientes com periodontite apresentam uma proporção AA / EPA muito semelhante aos pacientes com gengivite (20: 1 e 23: 1, respectivamente), resultado corroborado por um perfil semelhante de baixa ingestão de ω -3 AGPI-CL, de acordo com a Organização Mundial de Saúde e dentro do perfil da população da área urbana Ocidental (68-70), observados em nosso questionário de frequência alimentar. Embora Ramirez-Tortosa et al. (47) também tenham utilizado o questionário de frequência alimentar, eles não mostraram qualquer diferença dietética para ω -3 entre os pacientes e os controles, a razão ω -3 / ω -6 na circulação não foi reportado, o que poderia endossar os dados. Considerando que Requirand et al. (49) não

relataram a ingestão dietética ω -3, e a razão AA / EPA era significativamente mais elevada em doentes com a perda óssea (18: 1) do que os doentes sem perda óssea (8: 1) este dado sugere uma maior ingestão de ω -3 pelo grupo controle de difícil comparação entre grupos para os níveis séricos dos ácidos graxos. A relação entre níveis séricos da razão ω -6 / ω -3 AGPI-CL e os parâmetros clínicos periodontais deve ser investigada em populações com dieta Ocidental e Mediterrânea, comparando os pacientes com o mesmo perfil dietético.

Uma covariável que poderia contribuir para as diferenças encontradas na literatura é o subgrupo de pacientes com periodontite e com síndrome metabólica concomitantemente, que apresentaram níveis de DHA, DPA e EPA significativamente mais elevados quando comparados aos pacientes com periodontite sem síndrome metabólica, mas nenhuma diferença foi observada para os níveis de AA. Embora estudos realizados por Maruyama et al. (71) e Novgorodtseva et al. (72) tenham avaliado AGPI-CL em pacientes com síndrome metabólica e não encontraram qualquer diferença significativa para EPA e AA quando comparados com indivíduos saudáveis. As razões para essas discrepâncias são desconhecidas, mas os nossos resultados sugerem que a presença de síndrome metabólica em pacientes com periodontite pode influenciar os níveis de AGPI-CL e deve ser considerado durante os estudos dos AGPI-CL e doenças periodontais.

Em suma os resultados encontrados neste estudo em conjunto com a literatura mostram que o perfil inflamatório de acometimento sistêmico dos pacientes com periodontite pode ser sustentado pelo elevado nível sérico dos AGPI-CL precursores dos mediadores lipídicos envolvidos no processo inflamatório. Assim é sugerido que a patogênese da doença periodontal compartilha dos mesmos fatores envolvidos no metabolismo ou na regulação dos níveis sanguíneos dos ω -3 e ω -6 AGPI-CL. As evidências científicas e plausibilidade biológica incentivam a crescente investigação dos mediadores lipídicos na patogênese da doença periodontal. Estudos nas populações com diferente perfil de dieta, Ocidental e Mediterrânea, podem contribuir para as avaliações de incidência e risco à doença. A razão ω -3 / ω -6 na circulação pode ser correlacionada com o perfil da dieta independente do estado de saúde, embora a equilibrada ingestão seja sugerida como fator contribuinte para a manutenção da saúde e menor risco à doença. Estes resultados também são de interesse para a saúde pública, sugerindo avaliações e propostas nas medidas preventivas de saúde por intervenção no perfil dietético da população. Assim como a presente investigação favorece e estimula o tratamento interdisciplinar incluindo a odontologia e a nutrição no controle das doenças inflamatórias multifatoriais de amplo acometimento na população brasileira, como é o caso da periodontite crônica generalizada.

O perfil inflamatório dos pacientes com periodontite enseja alteração não somente sistêmica como também destruição no tecido periodontal irreversível caracterizados por sinais clínicos locais. A inflamação gengival é um fator de risco da periodontite, no entanto, a gengivite pode permanecer estável por meses ou anos e medidas de diagnóstico para identificar o ponto de verificação do aparecimento da periodontite são escassos. (1) Diagnóstico e avaliação de progressão da doença periodontal baseiam-se no exame clínico para a destruição dos tecidos periodontais ocorridos. Os critérios de classificação periodontais segundo a erosão óssea observada nas cristas do osso alveolar seriam de alto valor preditivo juntamente a identificação de marcadores que refletem a osteoclastogênese. No entanto, o diagnóstico precoce da destruição da crista óssea alveolar por métodos auxiliares à clínica está em falta na periodontia. Esse fato dificulta o tratamento precoce da periodontite a fim de evitar a destruição irreversível de tecidos, assim da atuação do clínico dentro do conceito da "janela de oportunidade". (73-74) A identificação de biomarcadores relacionados sobretudo a cada um dos componentes do tecido periodontal pode contribuir para melhor caracterizar o sítio periodontal e manuseá-lo. De acordo com a susceptibilidade e o risco a atividade, progressão e remissão da doença para cada sítio pode ser recomendada a estratégia trate-o-alvo e a "medicina personalizada". Algumas citocinas relacionadas a osteoclastogênese são referidas como possíveis biomarcadores para a destruição periodontal, no entanto, nenhuma destas foi definitivamente validada como um biomarcador da atividade ou progressão da doença periodontal.

Assim foram avaliadas algumas das citocinas relacionadas a osteoclastogênese no fluido gengival de sítios clinicamente comparáveis, sem considerável destruição óssea observada clínica e radiograficamente dos pacientes com gengivite e periodontite. E assim determinar se tais fatores poderiam refletir diferenças intrínsecas relacionadas a resposta e a susceptibilidade à doença com relação a crista óssea alveolar. Estes sítios apresentaram semelhantes medidas clínicas e porcentagem de sítios com presumível desmineralização óptica. Os níveis de IFN- γ , IL-10, RANK-L e OC foram encontrados mais elevados nos sítios dos pacientes com periodontite (controle-periodontite) em comparação com os sítios dos pacientes com gengivite (controle-gengivite), e a IL-4 apenas pode ser detectada nos sítios dos pacientes com periodontite. As citocinas, IL-4, IFN- γ e IL-10, são moléculas inibidoras de RANK-L que medeia a formação de osteoclastos envolvido na homeostase dos tecidos ósseos. O aumento do nível de RANK-L no fluido gengival de pacientes com periodontite foi anteriormente apresentado na literatura, e o nível de IFN- γ está relacionado com um aumento do risco de progressão da doença (75-76). Elevados níveis de IFN- γ , IL-10 e IL-4 em sítios

cl clinicamente saudáveis nos pacientes com periodontite comparado aos pacientes com gengivite foram adicionalmente relatado por Shaddox et al. (77), no entanto, não alcançou significância estatística. Por outro lado, Papathanasiou et al. (76) detectaram IL-4 apenas em 5,9% dos sítios de pacientes com gengivite e 9,1% dos sítios de pacientes com periodontite, além disso, alto nível de IL-4 tem sido associado a remissão em pacientes com periodontite. (78) A IL-10 tem sido associada com a gravidade da doença periodontal por apresentar elevado nível de IL-10 em sobrenadantes de tecido gengival a partir de pacientes com periodontite (79), no entanto, dados disponíveis sobre a IL-10 no fluido gengival de pacientes com periodontite são contraditórios. (80-81) Toker et al. (82) detectaram uma menor porcentagem de sítios com IL-10 na periodontite em comparação com pacientes saudáveis, enquanto Gamamol et al. (79) não foram capazes de detectar IL-10 nos indivíduos saudáveis. Estas diferenças podem refletir diferenças na definição do sítio, ou fase predominante do processo inflamatório, mas também podem refletir a diversidade de metodologia de amostra utilizada pela coleta do fluido gengival. Em resumo, mostramos alterado nível de citocinas no fluido gengival em sítios sem considerável destruição clínica do tecido periodontal de pacientes com periodontite, sítio controle-periodontite, com níveis mais elevados de IFN- γ , IL-4, IL-10, RANKL e OC em comparação com os sítios clinicamente similares ou comparáveis de pacientes com gengivite, controle-gengivite, sugerindo diferenças intrínsecas para a resposta inflamatória dos indivíduos doentes e sadios.

Ao avaliarmos as diferenças entre os sítios clinicamente definidos como destruídos em comparação com controle-periodontite de pacientes com periodontite foi possível detectamos a altura óptica da perda da crista óssea alveolar, os níveis de IL-1 β e OPG significativamente maiores nos sítios destruídos. A altura óptica da perda óssea alveolar reflete o dano ósseo tardio irreversível seguido por parâmetros clínicos periodontais de destruição do tecido, este é utilizado para avaliar a sequela da periodontite. A relação da IL-1 β com a progressão da doença é amplamente relatada na literatura, e a IL-1 β é considerada uma citocina fundamental na destruição dos tecidos periodontais. (83) Enquanto os estudos sobre a expressão da OPG são controversos mostrando reduzido nível de OPG em sítios de pacientes com periodontite em comparação com os sítios de pacientes com gengivite, não há diferenças, ou maior expressão em peri-implantite em comparação com sítios de implantes saudáveis. (84-90) É possível notar que nenhum destes estudos relaciona a expressão de citocinas com o grau de densidade do osso alveolar. Na artrite reumatóide, embora a remissão clínica seja obtida, em alguns doentes, a progressão estrutural das articulações pode ocorrer. (91) O conceito de "*Outside-Inside*" sugeriu um início de doença artrite reumatóide também na medula óssea

subcondral. (92) Na artrite reumatóide, o aumento da erosão óssea após o início clínico da doença em alguns pacientes pode continuar após a inflamação tenha cessado. (93) Inibidores de TNF- α e outros inibidores biológicos reduzem a sinovite, os biomarcadores da inflamação, e a destruição óssea. No entanto, tem sido relatada dissociação entre o efeito clínico e radiográfico dos inibidores de TNF- α . Estes inibidores de TNF- α são capazes de bloquear a destruição articular, mesmo se a doença artrite reumatóide ainda está ativa. (94-96) A terapia periodontal com o uso de droga sistêmica ou locais com inibidores de mediadores ainda está falta. Identificar biomarcadores envolvidos no metabolismo de cada componente do tecido periodontal, no caso enfatizado em nosso estudo o osso alveolar, pode contribuir para melhor definição da principal via da osteoclastogênese podendo contribuir para caracterização e manuseio do sítio ou paciente de acordo com o risco de atividade de reabsorção óssea.

Nós apresentamos aqui a primeira evidência para uma relação entre as citocinas relacionadas a osteoclastogênese no fluido gengival e alterações da densidade óptica alveolar em pacientes com periodontite. É intrigante como a avaliação da densidade óptica pode refletir o dano clínico periodontal precoce. Detectamos níveis significativamente mais elevados de RANK-L / OPG, OPG e OC em sítios clinicamente definidos como controle-periodontite e com desmineralização óptica presumida comparado aos sítios sem desmineralização óptica considerável. Além disso, os sítios destruídos com desmineralização óptica apresentaram níveis significativamente maiores de RANK-L e IL-6, enquanto que a IL-1 β e IL-10 exibiram níveis menores em comparação com os sítios sem desmineralização óptica. O aumentado nível observado para RANK-L e IL-6 em sítios destruídos com desmineralização ópticas é consistente com a literatura que mostra elevado nível dos sítios progressivos para a doença periodontal. (97-98) Esta constatação sugere a utilização da densidade óptica como um substituto para o diagnóstico de danos periodontais. Isso pode melhorar a classificação e ensejar intervenções terapêuticas mais individualizadas e, potencialmente, conduzir a identificação de sítios de risco antes de ocorrência de prejuízos irreversíveis. Futuros estudos devem ser direcionados para o valor preditivo da densidade óptica alveolar para o monitoramento dos danos e recuperação nos tecidos periodontais.

Apesar do potencial envolvimento de outros fatores no processo de destruição óssea, a expressão proeminente de RANK-L por células B e T na lesão da doença periodontal parece desempenhar um papel principal no aumento da reabsorção óssea. (99) Sugere-se que a inibição de RANK-L pode representar uma importante estratégia terapêutica para a prevenção da progressiva perda do osso alveolar. Na artrite reumatóide, alterações articulares causadas pela alta expressão crônica de TNF- α não são completamente bloqueados por monoterapias

que têm como alvo o TNF α , IL-1, ou RANK-L. No entanto, as abordagens combinadas, especialmente o bloqueio combinado de TNF- α e IL-1 e, em menor grau, o TNF- α e RANK-L, levam a uma remissão quase completa da doença. As diferenças na capacidade de bloquear a inflamação sinovial, erosão do osso, e destruição da cartilagem reforçar ainda mais a razão para a utilização de bloqueio combinado de mais do que uma via denominada pró-inflamatória. (100) Warren et al. (101) tomaram uma nova abordagem para bloquear a ação do membro da superfamília TNF- α RANKL com maior afinidade ao receptor de RANK, mas com diminuída afinidade para o receptor OPG. Esta abordagem pode ser generalizada para permitir que a inibição de outros sistemas de receptores de sinalização de TNF- α , que estão implicados numa vasta gama de condições patológicas.

O presente estudo mostra que o tratamento periodontal reduziu os níveis séricos de todos os AGPI-CL analisados no grupo RAR + placebo. Além disso, como ambos ω -3 e ω -6 AGPI-CL contribuem para as fases denominadas pró-inflamatória e pró-resolução, também é razoável que tais níveis basais retornem ao estado considerado fisiológico. (102) Para o melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a monitorar os níveis séricos de AGPI-CL durante o tratamento periodontal. A redução de ambos ω -3 e ω -6 AGPI-CL no soro após o tratamento periodontal está em linha com resultados transversais onde AGPI-CL foram significativamente correlacionados com a profundidade da bolsa média que sugerem uma possível melhora no estado geral de saúde e resultado periodontal. No nosso estudo foi observada uma diminuição significativa de IFN- γ , IL-6, IL-8 e OC no fluido gengival em sítios controle-periodontite, mas não de IL-10, enquanto que a IL-4 tende a aumentar depois do tratamento periodontal não-cirúrgico que está de acordo com estudos anteriores que avaliaram alterações de citocinas no fluido gengival após o tratamento periodontal. (103-104) No entanto, em nosso conhecimento essa é a primeira vez que é apresentada a diminuição do nível de OC após a terapia periodontal não-cirúrgica, o tratamento de pacientes com periodontite com doxiciclina e subantimicrobial em mulheres na pós-menopausa não conseguiu reduzir os níveis no fluido gengival. (105, 88) Em nosso estudo, observamos uma diminuição significativa na IL-6, IL-8 e OC em sítios destruídos após o tratamento periodontal não-cirúrgico apoiado por observações anteriores (79, 104), embora as alterações de nível OC após a terapia periodontal não-cirúrgica tenha falhado (105, 88). Os nossos resultados, assim, compartilham da concepção da IL-6 como uma citocina chave na patogênese periodontal. E os níveis reduzidos de IL-6, IL-8 e OC podem refletir a resposta ao tratamento periodontal não-cirúrgico. Se estas citocinas poderiam prever danos futuro terá de ser melhor avaliadas através de estudos prospectivos.

Nossos pacientes com periodontite apresentaram uma razão muito elevada AA / EPA 20: 1 e o consumo inferior a 250 mg / d (DHA + EPA) recomendado pela FAO / OMS para adultos (2009) e as Orientações dietéticas dos Estados Unidos da América 2010, insuficiente ou não eficientes na prestação de níveis corporais disponíveis adequados para EPA e DHA, que justificam o consumo de suplemento com ω -3. Nós investigamos se o tratamento periodontal e sua associação com a suplementação à base de ω -3 afeta os níveis séricos dos AGPI-CL e o resultado clínico periodontal aos 4 meses. O presente estudo mostra que a RAR + ω -3 reduziu os níveis séricos dos ácidos graxos não incluídos no suplemento dietético, AA e DPA, ao passo que os níveis de EPA e DHA são sustentados pela suplementação. A suplementação com ω -3 parece aumentar os níveis de EPA e DHA no soro. Tong et al. (14) observaram que os pacientes saudáveis suplementados com 3 g / dia de óleo de peixe por 4 semanas mostraram 6,5 vezes mais elevados os níveis de EPA em comparação com um grupo placebo, e os níveis de DPA 2,2 vezes mais elevadas em comparação com um grupo placebo, enquanto que os níveis de DHA não diferiram entre os grupos. Além disso, Dawczynski et al. (15) mostraram que a suplementação com ω -3 AGPI-CL aumentou significativamente os níveis de soro de DHA e EPA em mulheres com artrite reumatóide. No presente estudo, todas as razões entre os API-CL analisadas foram significativamente menores no grupo RAR + ω -3 em comparação com o grupo RAR + placebo, após as terapias, atingindo proporções próximas as encontradas em populações com uma dieta Mediterrânea. (106)

Os potenciais benefícios terapêuticos sistêmicos da suplementação dietética com ω -3 AGPI-CL para melhorar o estado geral de saúde têm despertado grande interesse para investigar a repercussão local. A intervenção com RAR + ω -3 aumentou significativamente a o nível de IL-4 no fluido gengival de sítios denominados clinicamente como controle-periodontite e destruídos em pacientes com periodontite, enquanto os níveis de IFN- γ e IL-10 diminuíram significativamente nos sítios destruídos, em nosso estudo. Neste contexto, a expressão de ResolvinE1, derivado do ω -3, aumentou significativamente o nível de OPG sem induzir alterações nos níveis de RANK-L indicando que ResolvinE1 modula a diferenciação de osteoclastos e remodelação óssea por ação direta sobre o osso, resgatando produção OPG e restaurando uma razão RANKL / OPG favorável, em culturas ósseas *in vitro*. (107) Além disso, foi mostrado que ResolvinE1 inibi a perda de osso periodontal induzida pela periodontite experimental. (108) Nosso estudo incentiva investigações em humanos neste campo do osso alveolar, e em seguida, observa que grupo selecionado de sítios com desmineralização óptica poderia reproduzir evidências consistentes. No entanto, a análise

clínica do estado periodontal não conseguiu demonstrar qualquer diferença entre os grupos RAR + ω -3 e RAR + placebo.

Rosenstein et al. (20) estudaram o efeito clínico da suplementação dietética com ω -3 ou ω -6 AGPI-CL, ou uma combinação de ambos, sem qualquer tratamento periodontal. Esse estudo mostrou uma diminuição significativa do índice gengival e profundidade de bolsa após a suplementação com ω -6, enquanto ω -3 não teve efeito significativo. Campan et al. (19) suplementou com ω -3 AGPI-CL os indivíduos com gengivite experimental, a fim de melhorar a resolução da inflamação. O estudo falhou em mostrar uma diferença entre os ω -3 AGPI-CL e placebo. É possível que o resultado do tratamento periodontal seja principalmente dependente das condições locais. Um efeito denominado anti-inflamatório adicional do ω -3 AGPI-CL pode ser tão pequeno que não foi clinicamente mensurável, talvez por observações clínicas um maior tamanho da amostra poderia promover evidências mais consistentes. Embora seja muito difícil seguir um maior número de pacientes por um longo período, o presente estudo encoraja mais investigações neste campo. O estudo recente com 30 doentes em cada grupo, Deore et al. (109), sugeriu que ω -3 melhora o sucesso do resultado periodontal. El-Sharkawy et al. (5) e Naqvi et al. (110) avaliaram o efeito da suplementação com ω -3 AGPI-CL associada com baixas doses de aspirina como um adjunto à raspagem e uma redução significativa de profundidade da bolsa e ganho de inserção clínica após o tratamento comparado com o placebo puderam ser observadas. Da mesma forma, Elkouli (21) mostrou melhor cicatrização dos defeitos de bifurcação após a suplementação com ω -3 AGPI-CL e baixa dose de aspirina. É difícil interpretar os estudos visto que os ω -3 AGPI-CL são combinados com aspirina. Quando a aspirina é utilizada em conjunto com ω -3 AGPI-CL o ω -3 é metabolizado em moléculas de resolvinas e lipoxinas de compostos que são mais duradouros e mais potentes do que resolvinas e lipoxinas endógenas. (111)

CONCLUSÃO

Em conclusão, os níveis séricos dos AGPI-CLs são afetados pela gravidade de doença periodontal e diferem com a presença da síndrome metabólica. Citocinas relacionadas a osteoclastogênese no FG refletem a gravidade periodontal e diferem com densidade óptica alveolar alterada. A suplementação com ω -3 não melhora clínica ou imunologicamente o resultado do tratamento periodontal não-cirúrgico.

REFERÊNCIAS

1. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2001; 25:8–20.
2. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997;14:9-11.
3. Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1984;11:21-32.
4. Golub LM, Ryan ME, Williams RC. Modulation of the host response in the treatment of periodontitis. *Dent Today*. 1998;17:102–6.
5. El-Sharkawy H, Aboelsaad N, Eliwa M. Adjunctive treatment of chronic periodontitis with daily dietary supplementation with omega-3 fatty acids and low-dose aspirin. *J Periodontol*. 2010;81:1635–43.
6. Racine RA, Deckelbaum RJ. Sources of the very-long-chain unsaturated omega-3 fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10:123–8.
7. Sijben JW, Calder PC. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. *Proc Nutr Soc*. 2007;66:237–59.
8. Sonestedt E, Ericson U, Gullberg B, Skog K, Olsson H, Wirfalt E. Do both heterocyclic amines and omega-6 polyunsaturated fatty acids contribute to the incidence of breast cancer in postmenopausal women of the Malmo diet and cancer cohort? *Int J Cancer*. 2008;123:1637–43.
9. Khanaki K, Nouri M, Ardekani AM. Evaluation of the relationship between endometriosis and omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Iran Biomed J*. 2012;16:38–43.
10. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation an autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr*. 2002;21:495–505.

11. Hayakawa S, Yoshikawa D, Ishii H. Association of plasma omega-3 to omega-6 polyunsaturated fatty acid ratio with complexity of coronary artery lesion. *Intern Med.* 2012;51:1009–14.
12. Fats and fatty acids in human nutrition. Proceedings of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. November 10–14, 2008. Geneva, Switzerland. *Ann Nutr Metab.* 2009;55:5–300.
13. McGuire S. U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services, dietary guidelines for Americans, 2010, 7th edition. Washington, DC: U.S. Government Printing Office. *Adv Nutr.* 2011;2:293.
14. Tong H, Rappold AG, Diaz-Sanchez D. Omega-3 fatty acid supplementation appears to attenuate particulate air pollution induced cardiac effects and lipid changes in healthy middle-aged adults. *Environ Health Perspect.* 2012;120:952–7.
15. Dawczynski C, Schubert R, Hein G. Long-term moderate intervention with n-3 long-chain PUFA-supplemented dairy products: effects on pathophysiological biomarkers in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Nutr.* 2009;101:1517–26.
16. Miles EA, Calder PC. Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *Br J Nutr.* 2012;107:S171–84.
17. Cabré E, Domènech E. Impact of environmental and dietary factors on the course of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2012;18:3814–22.
18. Kesavalu L, Vasudevan B, Raghu B. Omega-3 fatty acid effect on alveolar bone loss in rats. *J Dent Res.* 2006;85:648–52.
19. Campan P, Planchand P, Duran D. Pilot study on n-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of human experimental gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1997;24:907–13.
20. Rosenstein ED, Kushner LJ, Kramer N, Kazandjian G. Pilot study of dietary fatty acid supplementation in the treatment of adult periodontitis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;68:213–18.
21. Elkhoul AM. The efficacy of host response modulation therapy (omega-3 plus low-dose aspirin) as an adjunctive treatment of chronic periodontitis (clinical and biochemical study). *J Periodontol Res.* 2011;46:261–68.

22. Barros FC, Braga FF, Fischer RG, Figueredo CM. Effects of nonsurgical periodontal treatment on the alveolar bone density. *Braz Dent J.* 2014;25(2):90-5.
23. Szewczyk J, Koszowski R, Juźwiak R, Smieszek-Wilczewska J. A radiographic assessment of the regeneration process in post-operative alveolar bone defects in patients with different IL-1B-511 genotypes. *Adv Clin Exp Med.* 2013;22(6):847-54.
24. Reinhardt RA, Stoner JA, Golub LM, Lee HM, Nummikoski PV, Sorsa T, Payne JB. Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis. *J Periodontol.* 2010;81(2):251-9.
25. Rosa GM, Lucas GQ, Lucas ON. Cigarette smoking and alveolar bone in young adults: a study using digitized radiographs. *J Periodontol.* 2008;79(2):232-44.
26. Hwang YJ, Fien MJ, Lee SS, Kim TI, Seol YJ, Lee YM, et al. Effect of scaling and root planing on alveolar bone as measured by subtraction radiography. *J Periodontol.* 2008;79(9):1663-9.
27. Hoff M, Haugeberg G, Odegård S, Syversen S, Landewé R, van der Heijde D, et al. Cortical hand bone loss after 1 year in early rheumatoid arthritis predicts radiographic hand joint damage at 5- year and 10-year follow-up. *Ann. Rheum. Dis.* 2009;68:324–9.
28. van der Heijde D, van der Helm-van Mil AH, Aletaha D, Bingham CO, Burmester GR, Dougados M, et al. EULAR definition of erosive disease in light of the 2010 ACR/EULAR rheumatoid arthritis classification criteria. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(4):479-81.
29. Haavardsholm, E. A., Bøyesen, P., Østergaard, M., Schildvold, A., Kvien, T. K. Magnetic resonance imaging findings in 84 patients with early rheumatoid arthritis: bone marrow oedema predicts erosive progression. *Ann. Rheum. Dis.* 2008;67:794–800.
30. McQueen FM, Benton N, Perry D, Crabbe J, Robinson E, Yeoman S, et al. Bone edema scored on magnetic resonance imaging scans of the dominant carpus at presentation predicts radiographic joint damage of the hands and feet six years later in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48; 1814–27.
31. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2008;118:3537–45.

32. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1585-91.
33. Hecht C, Englbrecht M, Rech J, Schmidt S, Araujo E, Engelke K, et al. Additive effect of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor on bone erosions in patients with RA. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(12):2151-6.
34. de Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YP, Verpoort KN, Schreuder GM, Ewals JA, Terwiel JP, et al. Progression of joint damage in early rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1, rheumatoid factor, and anti-citrullinated protein antibodies in relation to different treatment strategies. *Arthritis Rheum.* 2008;58(5):1293-8.
35. Alarcon RT, Fernandes Ada R, Laurindo IM, Bértolo MB, Pinheiro GC, Andrade LE. Characterization of cumulative joint damage patterns in patients with rheumatoid arthritis: a clinical, serological, and gene polymorphism perspective. *J Rheumatol.* 2015;42(3):405-12.
36. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:139-50.
37. Kremer JM, Lawrence DA, Petrillo GF. Effects of high-dose fish oil on rheumatoid arthritis after stopping nonsteroidal anti-inflammatory drugs: clinical and immune correlates. *Arth Rheum.* 1995;38:1107–114.
38. Kolahi S, Ghorbanihaghjo A, Alizadeh S. Fish oil supplementation decreases serum soluble receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/osteoprotegerin ratio in female patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem.* 2010;43:576–80.
39. Kremer JM, Lawrence DA, Jubiz W. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. *Arth Rheum.* 1990; 33:810–20.
40. Siriwardhana N, Kalupahana NS, Fletcher S, Xin W, Claycombe KJ, Quignard-Boulangé A, et al. n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids differentially regulate adipose angiotensinogen and other inflammatory adipokines in part via NF- κ B-dependent mechanisms. *J Nutr Biochem.* 2012;23(12):1661-7.
41. Nakanishi A, Iitsuka N, Tsukamoto I. Fish oil suppresses bone resorption by inhibiting osteoclastogenesis through decreased expression of M-CSF, PU.1, MITF and RANK in ovariectomized rats. *Mol Med Rep.* 2013;7(6):1896-903.

42. Kruger MC, Coetzer H, de Winter R, Gericke G, van Papendorp DH. Calcium, gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid supplementation in senile osteoporosis. *Aging*. 1998;10:385–94.
43. Watkins BA, Li Y, Lippman HE, Seifert MF. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and skeletal health. *Exp Biol Med*. 2001;226(6):485-97.
44. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4:1–6.
45. WHO Expert Committee on Physical Status. The use and interpretation of anthropometry. Geneva: World Health Organization; 1995.
46. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) *JAMA* 2001;285:2486-97.
47. Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, Battino M, Granados S, Morillo JM, Bompadre S, et al. Periodontitis is associated with altered plasma fatty acids and cardiovascular risk markers. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 2010; 20:133-9.
48. Elabdeen HR, Mustafa M, Szklenar M, Rühl R, Ali R, Bolstad AI. Ratio of pro-resolving and pro-inflammatory lipid mediator precursors as potential markers for aggressive periodontitis. *PLoS One*. 2013;12;8(8):e70838.
49. Requirand P, Gibert P, Tramini P, Cristol JP, Descomps B. Serum fatty acid imbalance in bone loss: example with periodontal disease. *Clinical Nutrition*. 2000;19(4):271-6.
50. Calder PC. Ω -3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: From molecular biology to the clinic. *Lipids*. 2003;38:343-52.
51. Zubery Y, Dunstan CR, Story BM. Bone resorption caused by three periodontal pathogens in vivo in mice is mediated in part by prostaglandin. *Infect Immun*. 1998;66:4158-62.
52. Zhou L, Nilsson A. Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *J Lipid Res*. 2001;42:1521-42.
53. Kantarci A, Van Dyke TE. Lipoxin signaling in neutrophils and their role in periodontal disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;73:289-99.

54. Badr KF, DeBoer DK, Schwartzberg M, Serhan CN. Lipoxin A4 antagonizes cellular and in vivo actions of leukotriene D4 in rat glomerular mesangial cells: Evidence for competition at a common receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:3438-42.
55. Fredman G, Oh SF, Ayilavarapu S, Hasturk H, Serhan CN, Van Dyke TE. Impaired phagocytosis in localized aggressive periodontitis: Rescue by Resolvin E1. *PLoS ONE* 2011;6:e24422.
56. Brasky TM, Darke AK, Song X, Tangen CM, Goodman PJ, et al. Plasma phospholipid fatty acids and prostate cancer risk in the SELECT trial. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105:1132–1141.
57. Dahm CC, Gorst-Rasmussen A, Crowe FL, Roswall N, Tjønneland A, Drogan D, et al. Fatty acid patterns and risk of prostate cancer in a case-control study nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr*. 2012;96:1354–61.
58. Sorongon-Legaspi MK, Chua M, Sio MC, Morales M Jr. Blood level omega-3 Fatty acids as risk determinant molecular biomarker for prostate cancer. *Prostate Cancer*. 2013;2013:875615.
59. Chua ME, Sio MC, Sorongon MC, Dy JS. Relationship of dietary intake of omega-3 and omega-6 Fatty acids with risk of prostate cancer development: a meta-analysis of prospective studies and review of literature. *Prostate Cancer*. 2012; 2012:826254.
60. Bosire C, Stampfer MJ, Subar AF, Park Y, Kirkpatrick SI, Chiuve SE, et al. Index-based dietary patterns and the risk of prostate cancer in the NIH-AARP diet and health study. *Am J Epidemiol*. 2013; 177:504–513.
61. Iwasaki M, Yoshihara A, Moynihan P, Watanabe R, Taylor GW, Miyazaki H. Longitudinal relationship between dietary ω -3 fatty acids and periodontal disease. *Nutrition*. 2010;26(11-12):1105-9.
62. Iwasaki M, Taylor GW, Moynihan P, Yoshihara A, Muramatsu K, Watanabe R, et al. Dietary ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids and periodontal disease in community-based older Japanese: a 3-year follow-up study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2011;85(2):107-12.
63. Naqvi AZ, Buettner C, Phillips RS, Davis RB, Mukamal KJ. n-3 fatty acids and periodontitis in US adults. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(11):1669-75.

64. Baylin A, Campos H. The use of fatty acid biomarkers to reflect dietary intake. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17:22-27.
65. Baylin A, Kim MK, Donovan-Palmer A. Fasting whole blood as a biomarker of essential fatty acid intake in epidemiologic studies: Comparison with adipose tissue and plasma. *Am J Epidemiol*. 2005;162:373-381.
66. Rizzo AM, Montorfano G, Negroni M. A rapid method for determining arachidonic:eicosapentaenoic acid ratios in whole blood lipids: Correlation with erythrocyte membrane ratios and validation in a large Italian population of various ages and pathologies. *Lipids Health Dis*. 2010;9:7.
67. Dawczynski C, Hackermeier U, Viehweger M, Stange R, Springer M, Jahreis G. Incorporation of ω -3 PUFA and g-linolenic acid in blood lipids and red blood cell lipids together with their influence on disease activity in patients with chronic inflammatory arthritis — A randomized controlled human intervention trial. *Lipids Health Dis*. 2011;10:130.
68. Kennedy ET, Luo H, Ausman LM. Cost implications of alternative sources of (ω -3) fatty acid consumption in the United States. *J Nutr*. 2012;142:605S-609S.
69. Mozaffarian D, Wu JH. (ω -3) fatty acids and cardiovascular health: Are effects of EPA and DHA shared or complementary? *J Nutr*. 2012;142:614S-625S.
70. Levy-Costa RB, Sichieri R, Pontes NdosS, Monteiro CA. [Household food availability in Brazil: Distribution and trends (1974-2003)]. *Rev Saude Publica*. 2005;39:530-40.
71. Maruyama C, Yoneyama M, Suyama N. Differences in serum phospholipid fatty acid compositions and estimated desaturase activities between Japanese men with and without metabolic syndrome. *J Atheroscler Thromb*. 2008;15:306-13.
72. Novgorodtseva TP, Karaman YK, Zhukova NV, Lobanova EG, Antonyuk MV, Kantur TA. Composition of fatty acids in plasma and erythrocytes and eicosanoids level in patients with metabolic syndrome. *Lipids Health Dis*. 2011;10:82.
73. Emery P, Breedveld FC, Dougados M, Kalden JR, Schiff MH, Smolen JS. Early referral recommendation for newly diagnosed rheumatoid arthritis: evidence based development of a clinical guide. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2002;61(4):290-7.
74. O'Dell JR. Treating rheumatoid arthritis early: a window of opportunity?" *Arthritis and Rheumatism*. 2002;46(2):283-5.

75. Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N, et al. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2009;80(2):290-6.
76. Papathanasiou E, Teles F, Griffin T, Arguello E, Finkelman M, Hanley J, et al. Gingival crevicular fluid levels of interferon-c, but not interleukin-4 or -33 or thymic stromal lymphopoietin, are increased in inflamed sites in patients with periodontal disease. *J Periodont Res*. 2014; 49:55–61.
77. Shaddox LM, Wiedey J, Calderon NL, Magnusson I, Bimstein E, Bidwell JA, et al. Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis. *J Dent Res*. 2011;90(9):1140-4.
78. Pradeep AR, Roopa Y, Swati PP. Interleukin-4, a T-helper 2 cell cytokine, is associated with the remission of periodontal disease. *J Periodont Res*. 2008; 43:712–6.
79. 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*. 200;71(10):1535-45.
80. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent*. 2004; 32:511-20.
81. Fujita Y, Ito H, Sekino S, Numabe Y. Correlations between pentraxin 3 or cytokine levels in gingival crevicular fluid and clinical parameters of chronic periodontitis. *Odontology*. 2012;100:215-21.
82. Toker H, Poyraz O, Eren K. Effect of periodontal treatment on IL-1b, IL-1ra, and IL10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 507–513.
83. Chaudhari AU, Byakod GN, Waghmare PF, Karhadkar VM. Correlation of levels of interleukin-1 β in gingival crevicular fluid to the clinical parameters of chronicperiodontitis. *J Contemp Dent Pract*. 2011;12(1):52-9.
84. Mogi M, Otagoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*. 2004;83:166-9.

85. Vernal, R, Chaparro, A, Graumann, R, Puente, J, Valenzuela, MA, Gamonal, J. Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol.* 2004;75:1586–91.
86. Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontol Res.* 2006;41:354–60.
87. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol.* 2007;34: 370–376.
88. Bullon P, Chandler L, Segura Egea JJ, Perez Cano R, Martinez Sahuquillo A. Osteocalcin in serum, saliva and gingival crevicular fluid: their relation with periodontal treatment outcome in postmenopausal women. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007;12(3):E193-7.
89. Sarlati F, Sattari M, Razzaghi S, Nasiri M. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin levels in gingival crevicular fluid. *Dent Res J (Isfahan).* 2012;9:752-7.
90. Rakic M, Lekovic V, Nikolic-Jakoba N, Vojvodic D, Petkovic-Curcin A, Sanz M. Bone loss biomarkers associated with peri-implantitis. A cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(10):1110-6.
91. Lillegraven S, Prince FHM, Shadick NA. Remission and radiographic outcome in rheumatoid arthritis: application of the 2011 ACR/EULAR remission criteria in an observational cohort. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2012;71(5):681–6.
92. Schett G, Firestein GS. Mr Outside and Mr Inside: classic and alternative views on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2010;69(5):787–9.
93. Brown AK, Conaghan PG, Karim Z, Quinn MA, Ikeda K, Peterfy CG, et al. An explanation for the apparent dissociation between clinical remission and continued structural deterioration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58, 2958–67.

94. Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *The New England Journal of Medicine*. 2000;343(22):1594–1602.
95. Genovese MC, Bathon JM, Martin RW. Etanercept versus methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: two-year radiographic and clinical outcomes. *Arthritis and Rheumatism*. 2002;46(6):1443–50.
96. Keystone EC, Kavanaugh AF, Sharp JT. Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebocontrolled, 52-week trial. *Arthritis and Rheumatism*. 2004;50(5):1400–11.
97. Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol*. 2008;35(3):206-14.
98. Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1995;22(11):885-90.
99. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*. 2006;169(3):987-98.
100. Zwerina J, Hayer S, Tohidast-Akrad M, Bergmeister H, Redlich K, Feige U, et al. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction. *Arthritis Rheum*. 2004;50(1):277-90.
101. Warren JT, Nelson CA, Decker CE, Zou W, Fremont DH, Teitelbaum SL. Manipulation of receptor oligomerization as a strategy to inhibit signaling by TNF superfamily members. *Sci Signal*. 2014;19;7(339):ra80.
102. Serhan CN, Hong S, Gronert K. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter pro-inflammation signals. *J Exp Med*. 2000;196:1025–37.

103. Tsai CC, Ku CH, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon-gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *Kaohsiung J Med Sci.* 2007;23(1):1-7.
104. Reis C, DA Costa AV, Guimarães JT, Tuna D, Braga AC, Pacheco JJ, et al. Clinical improvement following therapy for periodontitis: Association with a decrease in IL-1 and IL-6. *Exp Ther Med.* 2014;8(1):323-7.
105. Golub LM, Lee HM, Greenwald RA, Ryan ME, Sorsa T, Salo T, et al. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflamm Res.* 1997;46:310–319.
106. Gebauer SK, Psota TL, Harris WS, Kris-Etherton PM. ω -3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:1526S–1535S.
107. Gao L, Faibish D, Fredman G, Herrera BS, Chiang N, Serhan CN, et al. Resolvin E1 and chemokine-like receptor 1 mediate bone preservation. *J Immunol.* 2013;190(2):689-94.
108. Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, Arita M, Ebrahimi N, Chiang N, et al. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *Faseb J.* 2006;20:401–3.
109. Deore GD, Gurav AN, Patil R, Shete AR, Naiktari RS, Inamdar SP. Omega 3 fatty acids as a host modulator in chronic periodontitis patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *J Periodontal Implant Sci.* 2014;44(1):25-32.
110. Naqvi AZ, Hasturk H, Mu L, Phillips RS, Davis RB, Halem S, et al. Docosahexaenoic Acid and Periodontitis in Adults: A Randomized Controlled Trial. *J Dent Res.* 2014;26;93(8):767-73.
111. Arita M, Clish CB, Serhan CN. The contributions of aspirin and microbial oxygenase to the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: novel oxygenase products from omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:149-57.

APÊNDICE A - Artigo I- Serum levels of long-chain polyunsaturated fatty acids in patients with periodontal disease

J Periodontol • May 2013

Serum Levels of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Patients With Periodontal Disease

Carlos Marcelo Figueredo,*† Gisele L. Martinez,* Josely C. Koury,† Ricardo G. Fischer,* and Anders Gustafsson†

Background: Long-chain polyunsaturated fatty acids omega-3 and omega-6 (LC-PUFA n-3 and n-6) can function as important inflammatory modulators and also have a strong effect in the proresolving inflammatory processes. The aim of the authors is to analyze the serum levels of docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA), and arachidonic acid (AA) in patients with generalized chronic periodontitis (GCP) and compare these results with serum levels of patients with gingivitis only.

Methods: Twenty-one patients with untreated GCP (mean age: 46.0 ± 8.8 years) and 16 patients with gingivitis only (mean age: 31.5 ± 7.5 years) were investigated. The clinical examination included probing depth (PD), clinical attachment level, bleeding on probing, and plaque index. Blood samples were analyzed for the presence of DHA, EPA, DPA, and AA using gas chromatography.

Results: Significantly higher levels of DHA, DPA, EPA, and AA were observed in patients with GCP when compared with patients with gingivitis ($P = 0.007$, $P = 0.004$, $P = 0.033$, and $P = 0.001$, respectively). The differences were still significant even after the adjustments for age and sex. The PD showed a significant positive correlation with DHA ($r = 0.5$; $P = 0.003$), DPA ($r = 0.6$; $P < 0.001$), and AA ($r = 0.6$; $P < 0.001$).

Conclusion: The present findings suggest that serum levels of LC-PUFA n-3 and n-6 may be affected by the severity of periodontal disease. *J Periodontol* 2013;84:675-682.

KEY WORDS

Arachidonic acid; docosahexaenoic acids; eicosapentaenoic acid; inflammation mediators; periodontal diseases; unsaturated fatty acids.

* Faculty of Odontology, Department of Periodontology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil.

† Division of Periodontology, Institute of Odontology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

‡ Nutrition Institute, Rio de Janeiro State University.

Periodontal disease occurs because of a combination of factors including the presence of periodontopathic bacteria and high levels of proinflammatory cytokines.¹ The excessive production of inflammatory cytokines, arachidonic acid (AA)-derived eicosanoids, and other inflammatory agents (e.g., reactive oxygen species, adhesion molecules) are crucial for generating irreparable damage to host tissues and therefore activate the periodontal tissue breakdown.² Recently, the interest in the impact of fatty acids (FAs) in the pathogenesis of chronic inflammation, and especially in periodontal disease, has increased.³⁻⁷

FAs are naturally occurring dietary constituents that have extensive metabolic, structural, and functional roles within the body.⁸⁻¹¹ They are important sources of energy, major components of all cell membranes, and precursors to signaling molecules. FAs containing double bonds in the acyl chain are referred to as unsaturated FAs; an FA containing ≥ 2 double bonds is called a polyunsaturated FA (PUFA).¹² There are two main PUFAs: the omega-6 (n-6) and the omega-3 (or n-3). Basically, they cannot be synthesized by mammals and must be obtained through the diet.¹³ The most important long-chain (LC) PUFAs are n-3 derivatives docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA), and docosapentaenoic acid (DPA) and n-6 derivative AA.

doi: 10.1902/jop.2012.120171

The FAs DHA, EPA, DPA, and AA are involved in the regulation of inflammation. Oxidation of these substrates by cyclooxygenase, lipoxygenase, and cytochrome P-450 produces prostaglandins, leukotrienes (LT), lipoxins (LX), resolvins, and protectins.¹⁴ They act as intercellular signaling molecules and can have either pro- or anti-inflammatory effects.^{15,16} Whereas most AA-derived mediators aggravate inflammation, n-3 derived mediators display reduced or contrary effects.¹⁴ EPA or DHA use the same metabolic pathways and enzymes that metabolize AA to influence the inflammation course, binding to the same receptors as the AA-derived metabolites but possessing less potent inflammatory effects.^{16,17}

The levels of LC-PUFAs in serum have become established as a valid biochemical marker for assessing physiologic status,^{18,19} and interest has increased in measuring such levels in chronic inflammatory diseases. Maruyama et al.²⁰ and Novgorodtseva et al.²¹ evaluated LC-PUFAs in patients with metabolic syndrome (MetS) and both found no significant difference for EPA and AA compared with healthy individuals. On the other hand, Klein-Platat et al.²² found significantly higher DHA in normal-weight adolescents than in overweight adolescents with and without MetS. Only two studies^{6,7} investigated the plasma levels of LC-PUFAs in patients with periodontal disease. Requirand et al.⁷ showed that the level of n-6 AA was higher in patients with bone loss than in the control group, whereas the reverse was observed with n-3 EPA and DHA. Recently, Ramirez-Tortosa et al.⁶ found that there is an interrelationship between periodontitis, plasma FA profiles, and the increase in metabolic risk factors for cardiovascular disease. Both studies confirm that n-6 AA is related to patients with periodontal destruction, whereas the results for n-3 derivatives are controversial. Moreover, the interest in using a dietary supplementation with n-3 as an adjunct treatment for patients with periodontal disease²³⁻²⁶ has increased the need for better knowledge about serum levels of LC-PUFAs in different populations. In addition, a series of experimental periodontitis studies in rats reported promising data.²⁷⁻³¹ Based on such information, the authors of the present study hypothesized that severity of periodontal disease might influence the serum levels of such FAs, which should be taken into consideration before starting any supplementation.

Therefore, the aim of this study is to measure the serum levels of EPA, DHA, DPA, and AA in untreated patients with generalized chronic periodontitis (GCP) and compare the results with those in patients with gingivitis alone.

MATERIALS AND METHODS

Patient Selection

Twenty-one patients with GCP (seven males and 14 females; mean age: 46.0 ± 8.8 years) and 16 individuals

with gingivitis (three males and 13 females; mean age: 31.5 ± 7.5 years) participated in the study. All individuals were seeking treatment at the dental school of the Rio de Janeiro State University (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil. The study was conducted from January to August 2010. The Ethics Committee of the Pedro Ernesto University Hospital (UERJ, Rio de Janeiro, Brazil) approved the study protocol (2714/2010). Patients had ≥ 20 teeth and were diagnosed according to criteria described by the American Academy of Periodontology.³² The participants had no ongoing systemic disease and were not receiving any medication that could affect the periodontal conditions. They had not taken any antibiotics for ≥ 6 months and no non-steroidal anti-inflammatory drugs for 3 months. All individuals signed an informed consent form prior to enrollment.

Clinical Measurements

The clinical periodontal parameters measured were percentage of sites that bled on probing (BOP), plaque index (PI), probing depth (PD), and clinical attachment level (CAL). The PD and CAL were taken at six sites per tooth (mid-buccal, buccal, disto-buccal, mid-lingual, lingual, and disto-lingual) except for third molars. A periodontal computerized probe[§] was used together with a stent of silicone (1.0 mm plates).^{||} A tape measure was used to evaluate the waist circumferences. Blood pressure was evaluated by a fully automatic blood pressure monitor.[¶]

Food Frequency Questionnaire

The food frequency questionnaire (FFQ) was administered by a nutritionist during a face-to-face interview. The questionnaire is designed to capture the habitual food intake among adults, including questions about 30 food items grouped together according to the Brazilian meal pattern. Items in the FFQ included an extensive list of specific seafood and fish as well as walnuts, flaxseed, flaxseed oil, cod liver oil, and canola oil. For each item, the categories ranged from never to a number of times in each month, each week, or each day.

Blood Collection

Individuals were instructed not to eat for 12 hours before sample collection. Blood samples (20 mL) were obtained in the morning (8:00 am) by venous puncture into tubes containing or not containing an anticoagulant. A total of 4 mL was transferred to glass tubes[#] containing 7.2 mg K₂EDTA for glycated hemoglobin and blood count. Another 4 mL was transferred to glass tubes^{**} with 6 mg NaF and 12 mg

§ Florida Probe, Gainesville, FL.

|| Bio-Art, São Paulo, Brazil.

¶ Omron Healthcare, São Paulo, Brazil.

BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ.

** BD Vacutainer.

Na₂EDTA for glucose analysis. A total of 8 mL was transferred to clot activator glass tubes^{††} for lipid profile, high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), insulin, and n-3 and n-6 LC-PUFAs (EPA, DHA, DPA, and AA). All samples were immediately centrifuged for 5 minutes, except the K₂EDTA, and used for immediate analysis or stored at -70°C pending analyses.

Laboratory Assays

Plasma glucose, triacylglycerols, total cholesterol, high-density level cholesterol (HDL-c), low-density level cholesterol (LDL-c), very low-density level cholesterol (VLDL-c), glycated hemoglobin, insulin, and leukocytes count were measured using an automatic analyzer from the laboratory routine.^{‡‡} CRP levels were determined using a highly sensitive immunoturbidimetric assay.^{§§} Serum LC-PUFAs were analyzed after the extraction of lipids with oxidation prevented by the addition of butylated hydroxytoluene. The organic phase containing total lipids was dried under nitrogen flow, and the residue was methylated.³³ LC-PUFAs in serum were analyzed by gas chromatography. The identification and quantification of gas chromatographic peaks of FA methyl esters were performed using a commercial standard.^{|||}

Statistical Analyses

The sample size calculation estimated that 16 individuals should be required for an α of 0.05 and a power of 0.80. Data with normal distribution are presented as mean and standard deviation, whereas those with non-normally distributed data are presented as median and range. The significance of differences between groups was calculated using the Student *t* test, the Mann-Whitney *U* test, and analysis of variance (ANOVA), and significance was determined at 5% ($P < 0.05$). Analysis of covariance (ANCOVA) was used to adjust for age and sex. The Pearson correlation coefficient was calculated to evaluate correlations between clinical variables and LC-PUFAs, with $P < 0.01$. Analyses were performed using statistical software.^{¶¶}

RESULTS

FFQ Results

The FFQ showed, in the GCP group and in the group with gingivitis, respectively, 29% and 25% of patients consuming fish once a month, 19% and 31% two or three times a month, 24% and 25% once a week, and 29% and 19% two or three times a week. No one answered ≥ 4 times a week. The other dietary products rich in PUFA n-3 showed a frequency of < 1 time a month in both groups. Therefore, the estimated amount of LC-PUFA n-3 intake for both groups was < 250 mg/day (DHA+EPA), the amount recommended by

the World Health Organization (WHO),^{34,35} and the patients were considered homogeneous in habitual intake of LC-PUFA n-3.

Clinical Findings

The percentages of sites with PD ≤ 3 mm and CAL ≤ 1 mm were significantly higher in patients with gingivitis compared with patients with GCP. The percentage of positive sites with plaque was significantly higher in patients with GCP. However, there was no significant difference in the percentage of BOP between the groups (Table 1).

LC-PUFAs and Biologic Blood Parameters

Significantly higher levels of DHA, DPA, EPA, and AA were observed in patients with GCP compared with patients with gingivitis ($P = 0.007$, $P = 0.004$, $P = 0.033$, and $P = 0.001$, respectively). The differences were still significant even after the adjustments for age and sex. No significant difference was observed between the groups for the ratios of AA/EPA, AA/DHA, and AA/DPA (Table 2).

The levels of glycated hemoglobin and glucose were higher in patients with GCP compared with patients with gingivitis ($P = 0.025$ and $P = 0.018$, respectively). After the adjustment for age and sex, the difference remained significant for glycated hemoglobin ($P = 0.003$), the difference in glucose levels disappeared, and the levels of triglyceride became significantly higher in the patients with GCP ($P = 0.039$). For all the other parameters analyzed, there was no significant difference between the groups (Table 3).

The correlations between LC-PUFAs and clinical parameters are summarized in Table 4. The PD showed a significant positive correlation with DHA ($R = 0.5$; $P = 0.003$), DPA ($R = 0.6$; $P < 0.001$), and AA ($R = 0.6$; $P < 0.001$). PI and BOP showed no significant correlation.

Eight patients from the GCP group were diagnosed with MetS according to the Adult Treatment Panel III.³⁶ There were not sufficient data to confirm the MetS diagnosis in two patients from the GCP group. These patients presented significantly higher DHA, DPA, and EPA levels compared with patients with periodontitis without MetS and to patients with gingivitis alone (Table 5). No difference for such markers was observed between patients without MetS and patients with gingivitis. Regarding AA, no difference between patients with and without MetS was observed (Table 5).

†† BD Vacutainer.

‡‡ DLE, Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro, Brazil.

§§ DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Germany.

||| Supelco, Bellefonte, PA.

¶¶ SPSS version 19.0, IBM, Chicago, IL.

Table 1.
Mean \pm SD Values (%) for PD, CAL, PI, and BOP for Different Site Categories in Patients With GCP and Patients With Gingivitis

Variables	Categories	GCP (n = 21)	Gingivitis (n = 16)	P Value*
PD	≤ 3 mm	70.95 \pm 14.79	97.20 \pm 2.39	<0.001
	4 to 6 mm	20.71 \pm 9.83		
	≥ 6 mm	8.47 \pm 9.15		
CAL	≤ 1 mm	54.28 \pm 15.70	99.93 \pm 3.66	<0.001
	2 to 4 mm	34.06 \pm 11.54		
	≥ 5 mm	11.71 \pm 9.97		
PI		59.04 \pm 24.76	27.20 \pm 18.72	<0.001
BOP		19.03 \pm 16.60	14.97 \pm 11.60	0.411

* Comparison using the Student *t* test.

Table 2.
Mean \pm SD Values ($\mu\text{M/L}$) for DHA, EPA, DPA, and AA in Serum From Patients With GCP and Patients With Gingivitis

Variables	GCP (n = 21)	Gingivitis (n = 16)	P Value*	ANCOVA [†]
DHA	242.33 \pm 95.80	162.89 \pm 63.07	0.007	0.012
DPA	54.31 \pm 23.08	33.51 \pm 16.47	0.004	0.013
EPA	54.43 \pm 25.44	35.50 \pm 25.88	0.033	0.021
AA	959.93 \pm 311.90	598.20 \pm 270.85	0.001	0.008
AA/EPA	19.76 \pm 6.37	23.03 \pm 12.73	0.313	0.579
AA/DHA	4.18 \pm 1.10	3.67 \pm 0.85	0.134	0.440
AA/DPA	19.75 \pm 7.80	20.61 \pm 12.79	0.802	0.735

* Comparison using the Student *t* test.

[†] Data were compared using ANCOVA, adjusting for differences in age and sex among groups.

DISCUSSION

The present study shows that levels of LC-PUFAs n-3 DHA, EPA, and DPA and n-6 AA were significantly higher in serum from patients with GCP compared with patients with gingivitis. The implications of such findings are unknown, but the increase in using n-3 dietary supplementation during periodontal therapy indicates that it is necessary to know better the circulating levels of these FAs.

The authors' LC-PUFA n-6 (AA) findings are in line with Ramirez-Tortosa et al.,⁶ who found significantly higher AA levels in patients with periodontitis. Requirand et al.⁷ also found significantly higher AA levels in patients with alveolar bone loss compared with patients without alveolar bone loss. Taken together, these results suggest that higher serum AA levels are involved in the pathogenesis of periodontitis. LC-PUFA n-6 (AA) is involved in modulating the in-

tensity and duration of inflammatory responses¹⁷ and is also involved in the process that results in bone loss during experimental periodontitis.³⁷ Most of the cells involved in the inflammatory response are rich in AA;³⁸ the main proinflammatory products of AA metabolism are prostaglandins and LT. On the other hand, LX is the main AA end product related to the group of proresolving lipid mediators.³⁹ An inverse relationship between LT and LX synthesis by neutrophils is observed in rat glomerular mesangial cells.⁴⁰ Increased proinflammatory LT B4 (LTB4) and significantly less proresolving LX A4 (LXA4) are seen in the whole blood of patients with localized aggressive periodontitis compared with healthy controls, suggesting an imbalance in the production of proinflammatory and proresolving mediators.⁴¹ Furthermore, such neutrophils were unresponsive to LXA4 treatment, which may contribute

Table 3.**Mean \pm SD and Median (Range) Values for Biochemical Index in Patients With GCP and Patients With Gingivitis**

Variables	GCP (n = 21)	Gingivitis (n = 16)	P Value	ANCOVA*
Triglyceride [†] (mg/dL)	107.2 \pm 55.1	82.1 \pm 34.8	0.120	0.039
Cholesterol [†] (mg/dL)	199.1 \pm 35.0	190.62 \pm 40.2	0.459	0.199
HDL-c [‡] (mg/dL)	44.0 (64.0)	49.5 (54.0)	0.078	0.181
LDL-c [†] (mg/dL)	130.8 \pm 31.6	118.5 \pm 29.7	0.236	0.162
VLDL-c [‡] (mg/dL)	17.0 (39.0)	14.5 (121.0)	0.280	0.440
hs-CRP [‡] (mg/dL)	0.1 (1.4)	0.2 (4.1)	0.639	0.495
Leukocytes [†] (/mm ³)	6,330.0 \pm 2,017.5	7,828.8 \pm 2,682.2	0.095	0.115
Glycated hemoglobin [†] (%HbA1c)	5.5 \pm 0.3	5.2 \pm 0.2	0.025	0.003
Insulin [†] (μ UI/mL)	5.0 \pm 0.3	7.9 \pm 5.9	0.092	0.163
Glucose [†] (mg/dL)	98.9 \pm 9.1	91.6 \pm 8.5	0.018	0.107

* Data were compared using ANCOVA, adjusting for differences in age and sex among groups.

[†] Compared using the Student *t* test.

[‡] Compared using the Mann-Whitney *U* test.

Table 4.**Correlation Between DHA, EPA, DPA, and AA and Clinical Parameters**

Variables		DHA	DPA	EPA	AA	AA/EPA	AA/DHA	AA/DPA
PD (mm)	<i>r</i>	0.5	0.6	0.4	0.6	-0.2	0.2	0.1
	<i>P</i>	0.003	<0.001	0.02	<0.001	0.27	0.25	0.46
CAL (mm)	<i>r</i>	0.4	0.5	0.3	0.6	-0.1	0.3	0.06
	<i>P</i>	0.01	0.004	0.1	<0.001	0.7	0.04	0.7
PI	<i>r</i>	0.2	0.4	0.1	0.4	-0.1	0.3	-0.1
	<i>P</i>	0.2	0.03	0.4	0.01	0.56	0.08	0.61
BOP (%)	<i>r</i>	0	0.2	-0.1	0.1	0.2	0.1	-0.2
	<i>P</i>	0.98	0.15	0.54	0.5	0.39	0.44	0.28

Data were correlated using the Pearson correlation test.

to the establishment of a chronic inflammatory lesion and periodontal disease progression.³⁹

EPA and DHA levels are significantly higher in patients with GCP compared with patients with gingivitis in our results. On the other hand, Ramirez-Tortosa et al.⁶ did not find any significant difference for DHA when comparing patients with periodontitis with controls, and Requirand et al.⁷ found significantly lower EPA and DHA levels in patients with periodontal bone loss compared with controls. Such differences are difficult to explain but might be related to FA n-3 intake. The positive correlation between LC-PUFA n-3 intake and serum level has been observed in individuals with high consumption

of FA n-3.^{42,43} Rizzo et al.⁴⁴ and Dawczynski et al.⁴⁵ showed that the n-3/n-6 plasma ratio can be correlated with diet profile independent of the health status. In the present study, patients with GCP presented a very similar AA/EPA ratio compared with patients with gingivitis (20:1 and 23:1, respectively), corroborated by a similar FA intake profile observed in the FFQ. Moreover, both groups showed similar LC-PUFA n-3 dietary habits, which were lower than that recommended by WHO.^{34,35} Similar data were observed by Levy-Costa et al.,⁴⁶ who showed that the habitual intake of lipids in the general urban population is characterized by a relatively low intake of LC-PUFA, especially of the n-3 series. Ramirez-

Table 5.
Mean \pm SD Values (μ M/L) for DHA, EPA, DPA, and AA in Serum From Patients With GCP and Patients With Gingivitis

Variables	GCP With MetS (n = 8)	P1	GCP Without MetS (n = 11)	P2	Gingivitis Without MetS (n = 16)	P3	ANCOVA
DHA	301.63 \pm 116.4	0.035	206.05 \pm 65.26	0.097	162.89 \pm 63.07	0.001	0.001
DPA	63.36 \pm 20.49	0.024	43.71 \pm 14.12	0.107	33.51 \pm 16.47	0.001	0.001
EPA	72.30 \pm 26.07	0.016	44.69 \pm 19.14	0.326	35.50 \pm 25.88	0.003	0.005
AA	1,048.32 \pm 297.16	0.385	914.87 \pm 338.71	0.012	598.20 \pm 270.85	0.001	0.003
AA/DHA	3.86 \pm 1.50	0.299	4.43 \pm 0.78	0.028	3.67 \pm 0.85	0.695	0.174
AA/DPA	17.96 \pm 7.01	0.246	22.26 \pm 8.12	0.710	20.61 \pm 12.79	0.593	0.676
AA/EPA	16.30 \pm 7.35	0.087	21.44 \pm 5.00	0.700	23.03 \pm 12.73	0.184	0.293

P1 = comparisons between patients with GCP with MetS and patients with GCP without MetS; P2 = comparisons between patients with GCP without MetS and patients with gingivitis without MetS; P3 = comparisons between patients with GCP with MetS and patients with gingivitis without MetS.

Tortosa et al.⁶ also used the FFQ and showed no dietary PUFA n-3 difference between patients and controls. Requirand et al.⁷ mentioned nothing about the dietary PUFA n-3 intake by the patients; furthermore, the AA/EPA ratio was significantly higher for patients with bone loss (18:1) than for patients without bone loss (8:1).

The relation between the n-3 ratio and serum n-6 LC-PUFAs levels and the local effect on the periodontal lesion should be investigated in Western and Mediterranean populations comparing patients with the same dietary profile. A balanced ratio between LC-PUFA n-3 and n-6 is recommended by WHO⁴⁷ and seems to be important to reduce the risk of many chronic diseases in Western societies.⁴⁸ This benefit is attributed to novel LC-PUFA n-3 derived lipid mediators, known as resolvin,⁴⁹ that have been shown to display potent protective actions in experimental periodontitis in rabbits.²⁶

The authors of the present study reported that triglyceride, all cholesterol levels, hs-CRP levels, and leukocyte count were similar between patients with GCP and patients with gingivitis. After an ANCOVA analysis, triglyceride becomes significantly higher in patients with GCP. Recently, Korhonen et al.⁵⁰ reported that there is no evidence that unfavorable lipid intake can be considered an important risk for periodontal infection in a general adult population. Finally, glycosylated hemoglobin and glucose were significantly higher in patients with GCP, but still inside the reference values for human health.

A subgroup of patients with periodontitis with MetS presented significantly higher DHA, DPA, and EPA levels compared with patients without MetS, but no difference was observed for the AA

levels. Studies by Maruyama et al.²⁰ and Novgorodtseva et al.²¹ evaluated LC-PUFAs in patients with MetS, and neither found any significant difference for EPA and AA compared with healthy individuals. The reasons for these discrepancies are unknown, but the results of the present study suggest that the presence of MetS in patients with periodontitis might influence the PUFA levels, which should be taken into consideration during periodontal studies.

CONCLUSION

The present findings suggest that serum levels of LC-PUFA n-3 and n-6 may be affected by the severity of periodontal disease.

ACKNOWLEDGMENT

The authors report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

1. Page RC, Beck JD. Risk assessment for periodontal diseases. *Int Dent J* 1997;47:61-87.
2. Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: A new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res* 2003;82:82-90.
3. Iwasaki M, Yoshihara A, Moynihan P, Watanabe R, Taylor GW, Miyazaki H. Longitudinal relationship between dietary ω -3 fatty acids and periodontal disease. *Nutrition* 2010;26:1105-1109.
4. Iwasaki M, Taylor GW, Moynihan P, et al. Dietary ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids and periodontal disease in community-based older Japanese: A 3-year follow-up study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011;85:107-112.

5. Naqvi AZ, Buettner C, Phillips RS, Davis RB, Mukamal KJ. n-3 fatty acids and periodontitis in US adults. *J Am Diet Assoc* 2010;110:1669-1675.
6. Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, Battino M, et al. Periodontitis is associated with altered plasma fatty acids and cardiovascular risk markers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20:133-139.
7. Requirand P, Gibert P, Tramini P, Cristol JP, Descomps B. Serum fatty acid imbalance in bone loss: Example with periodontal disease. *Clin Nutr* 2000;19:271-276.
8. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:139-150.
9. Lands B. A critique of paradoxes in current advice on dietary lipids. *Prog Lipid Res* 2008;47:77-106.
10. Lemmon MA. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:99-111.
11. Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:162-176.
12. Calder PC. Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. *Eur J Pharmacol* 2011;668(Suppl. 1):S50-S58.
13. Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 2000;1486:219-231.
14. Ott J, Hiesgen C, Mayer K. Lipids in critical care medicine. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011;85:267-273.
15. Sijben JW, Calder PC. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. *Proc Nutr Soc* 2007;66:237-259.
16. Mayer K, Seeger W. Fish oil in critical illness. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:121-127.
17. Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: From molecular biology to the clinic. *Lipids* 2003;38:343-352.
18. Hjartaker A, Lund E, Bjerve KS. Serum phospholipid fatty acid composition and habitual intake of marine foods registered by a semi-quantitative food frequency questionnaire. *Eur J Clin Nutr* 1997;51:736-742.
19. Kobayashi M, Sasaki S, Kawabata T, Hasegawa K, Akabane M, Tsugane S. Single measurement of serum phospholipid fatty acid as a biomarker of specific fatty acid intake in middle-aged Japanese men. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:643-650.
20. Maruyama C, Yoneyama M, Suyama N, et al. Differences in serum phospholipid fatty acid compositions and estimated desaturase activities between Japanese men with and without metabolic syndrome. *J Atheroscler Thromb* 2008;15:306-313.
21. Novgorodtseva TP, Karaman YK, Zhukova NV, Lobanova EG, Antonyuk MV, Kantur TA. Composition of fatty acids in plasma and erythrocytes and eicosanoids level in patients with metabolic syndrome. *Lipids Health Dis* 2011;10:82.
22. Klein-Platat C, Draï J, Oujaa M, Schlienger JL, Simon C. Plasma fatty acid composition is associated with the metabolic syndrome and low-grade inflammation in overweight adolescents. *Am J Clin Nutr* 2005;82:1178-1184.
23. Campan P, Planchand PO, Duran D. Pilot study on n-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of human experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* 1997;24:907-913.
24. Rosenstein ED, Kushner LJ, Kramer N, Kazandjian G. Pilot study of dietary fatty acid supplementation in the treatment of adult periodontitis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;68:213-218.
25. Elkhoul AM. The efficacy of host response modulation therapy (omega-3 plus low-dose aspirin) as an adjunctive treatment of chronic periodontitis (clinical and biochemical study). *J Periodontol Res* 2011;46:261-268.
26. El-Sharkawy H, Aboelsaad N, Eliwa M, et al. Adjunctive treatment of chronic periodontitis with daily dietary supplementation with omega-3 fatty acids and low-dose aspirin. *J Periodontol* 2010;81:1635-1643.
27. Vardar S, Buduneli E, Türkoğlu O, et al. Therapeutic versus prophylactic plus therapeutic administration of omega-3 fatty acid on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2004;75:1640-1646.
28. Kesavalu L, Bakthavatchalu V, Rahman MM, et al. Omega-3 fatty acid regulates inflammatory cytokine/mediator messenger RNA expression in *Porphyromonas gingivalis*-induced experimental periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:232-239.
29. Vardar-Sengül S, Buduneli N, Buduneli E, et al. Dietary supplementation of omega-3 fatty acid and circulating levels of interleukin-1beta, osteocalcin, and C-reactive protein in rats. *J Periodontol* 2006;77:814-820.
30. Kesavalu L, Vasudevan B, Raghu B, et al. Omega-3 fatty acid effect on alveolar bone loss in rats. *J Dent Res* 2006;85:648-652.
31. Bendyk A, Marino V, Zilm PS, Howe P, Bartold PM. Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on experimental periodontitis in the mouse. *J Periodontol Res* 2009;44:211-216.
32. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.
33. Bhattacharya A, Lawrence RA, Krishnan A, Zaman K, Sun D, Fernandes G. Effect of dietary n-3 and n-6 oils with and without food restriction on activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in livers of cyclophosphamide treated autoimmune-prone NZB/W female mice. *J Am Coll Nutr* 2003;22:388-399.
34. Kennedy ET, Luo H, Ausman LM. Cost implications of alternative sources of (n-3) fatty acid consumption in the United States. *J Nutr* 2012;142:605S-609S.
35. Mozaffarian D, Wu JH. (n-3) fatty acids and cardiovascular health: Are effects of EPA and DHA shared or complementary? *J Nutr* 2012;142:614S-625S.
36. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-2497.
37. Zubery Y, Dunstan CR, Story BM, et al. Bone resorption caused by three periodontal pathogens in vivo in mice is mediated in part by prostaglandin. *Infect Immun* 1998;66:4158-4162.
38. Zhou L, Nilsson A. Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *J Lipid Res* 2001;42:1521-1542.
39. Kantarci A, Van Dyke TE. Lipoxin signaling in neutrophils and their role in periodontal disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005;73:289-299.
40. Badr KF, DeBoer DK, Schwartzberg M, Serhan CN. Lipoxin A4 antagonizes cellular and in vivo actions of leukotriene D4 in rat glomerular mesangial cells: Evidence for competition at a common receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3438-3442.

41. Fredman G, Oh SF, Ayilavarapu S, Hasturk H, Serhan CN, Van Dyke TE. Impaired phagocytosis in localized aggressive periodontitis: Rescue by Resolvin E1. *PLoS ONE* 2011;6:e24422.
42. Baylin A, Campos H. The use of fatty acid biomarkers to reflect dietary intake. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:22-27.
43. Baylin A, Kim MK, Donovan-Palmer A, et al. Fasting whole blood as a biomarker of essential fatty acid intake in epidemiologic studies: Comparison with adipose tissue and plasma. *Am J Epidemiol* 2005;162:373-381.
44. Rizzo AM, Montorfano G, Negroni M, et al. A rapid method for determining arachidonic:eicosapentaenoic acid ratios in whole blood lipids: Correlation with erythrocyte membrane ratios and validation in a large Italian population of various ages and pathologies. *Lipids Health Dis* 2010;9:7.
45. Dawczynski C, Hackermeier U, Viehweger M, Stange R, Springer M, Jahreis G. Incorporation of n-3 PUFA and γ -linolenic acid in blood lipids and red blood cell lipids together with their influence on disease activity in patients with chronic inflammatory arthritis — A randomized controlled human intervention trial. *Lipids Health Dis* 2011;10:130.
46. Levy-Costa RB, Sichieri R, Pontes NdosS, Monteiro CA. [Household food availability in Brazil: Distribution and trends (1974-2003)]. *Rev Saude Publica* 2005;39:530-540.
47. WHO (World Health Organization). WHO and FAO joint consultation: Fats and oils in human nutrition. *Nutr Rev* 1995;53:202-205.
48. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233:674-688.
49. Hasturk H, Kantarci A, Goguet-Surmenian E, et al. Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. *J Immunol* 2007;179:7021-7029.
50. Korhonen S, Saxlin T, Suominen L, Jula A, Knuutila M, Ylöstalo P. Serum cholesterol ratios and periodontal infection: Results of the Health 2000 Survey. *J Clin Periodontol* 2011;38:787-794.

Correspondence: Prof. Carlos Marcelo S. Figueredo, Department of Periodontology, Faculty of Odontology, Rio de Janeiro State University, Boulevard 28 de Setembro 157-Pavilhão de Pesquisa, Vila Isabel, Rio de Janeiro, Brazil 20551-030. E-mail: cmfigueredo@hotmail.com.

Submitted March 13, 2012; accepted for publication June 18, 2012.

APÊNDICE B - Artigo II- The impact of non-surgical periodontal treatment on serum levels of long chain-polyunsaturated fatty acids: a pilot randomized clinical trial

Journal of
PERIODONTAL RESEARCH

J Periodont Res 2013
 All rights reserved

© 2013 John Wiley & Sons A/S.
 Published by John Wiley & Sons Ltd

JOURNAL OF PERIODONTAL RESEARCH
 doi:10.1111/jre.12104

The impact of non-surgical periodontal treatment on serum levels of long chain-polyunsaturated fatty acids: a pilot randomized clinical trial

G. L. Martinez¹, J. C. Koury²
 F. Brito³, R. G. Fischer¹,
 A. Gustafsson⁴,
 C. M. Figueredo^{1,4}

¹Department of Periodontology, Faculty of Odontology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil, ²Nutrition Institute, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil, ³Division of Periodontology, Faculty of Odontology, Veiga de Almeida University, Rio de Janeiro, Brazil and ⁴Division of Periodontology, Institute of Odontology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

Martinez GL, Koury JC, Brito F, Fischer RG, Gustafsson A, Figueredo CM. The impact of non-surgical periodontal treatment on serum levels of long chain-polyunsaturated fatty acids: a pilot randomized clinical trial. *J Periodont Res* 2013; doi: 10.1111/jre.12104. © 2013 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

Background and Objective: Our group recently found higher levels of serum long chain-polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) in patients with chronic periodontitis compared to controls. However, the effect of periodontal treatment on LC-PUFA serum levels has not been investigated. The primary aim of the present study was to investigate the impact of periodontal treatment on LC-PUFA serum levels. A secondary aim was to assess the effect of dietary ω -3 supplementation on clinical outcome.

Material and Methods: The test group was composed of 10 patients with generalized chronic periodontitis (mean age 44 ± 6.4 years) treated with scaling and root planing associated with 4 mo of ω -3 supplementation eicosapentaenoic acid (EPA) plus docosahexaenoic acid (DHA), 3 g/d. The placebo group was composed of 11 patients (47.9 ± 10.5 years) that received scaling and root planing plus placebo. The periodontal examination included probing depth, clinical attachment level, bleeding on probing and visible plaque index. Docosapentaenoic acid (DPA), EPA, DHA and arachidonic acid (AA) were detected using gas chromatography.

Results: In the placebo group, all LC-PUFAs levels reduced significantly (DHA, DPA and AA, $p = 0.004$; EPA, $p = 0.008$). In the test group, only DPA and AA showed a significant reduction ($p = 0.005$). Moreover, a significant decrease in the ratios AA/EPA and AA/DHA ($p = 0.005$) was observed in the test group.

Conclusion: Non-surgical periodontal treatment reduced significantly the serum levels of all analyzed LC-PUFAs except those presented in the supplementation. The ω -3 dietary supplementation had no effect on clinical outcome of treatment.

Carlos M. Figueredo, PhD, Department of Periodontology, Faculty of Odontology, Rio de Janeiro State University, Boulevard 28 de Setembro 157, Pavilhão de Pesquisa, Vila Isabel, Rio de Janeiro 20551-030, Brazil
 Tel: +55 21 2868 8282
 Fax: +55 21 2868 8363
 e-mail: cmfigueredo@hotmail.com

Key words: non-surgical periodontal treatment; omega-3 supplementation; periodontitis; polyunsaturated fatty acid

Accepted for publication April 13, 2013

The concept of host response modulation to achieve better clinical results during periodontal therapy has been

introduced in the last decade (1). Among the possibilities of host modulation, was found the use of matrix

metalloproteinases inhibitors (TIMPs) (2), bisphosphonates (3), non-steroidal anti-inflammatory drugs (4) and

2 *Martinez et al.*

subantimicrobial doses of doxycycline (5). Recently, supplementation with ω -3 has been used with the intention of stimulating the expression of molecules involved in the inflammation resolution, such as resolvins (6).

Ω -3 long chain-polyunsaturated fatty acids (Ω -3 LC-PUFAs) are essential fatty acids that must be provided by dietary sources (7). Ω -3 LC-PUFAs derivatives eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA), and ω -6 LC-PUFAs derivative arachidonic acid (AA) are involved in the modulation of inflammation. They can have either pro- or anti-inflammatory effects (8).

Excessive amounts of ω -6 LC-PUFAs and high ω -6/ ω -3 ratio, as is found in today's Western diets, are related to the pathogenesis of many diseases, including cancer (9), endometriosis (10), inflammatory and autoimmune disease (11), and cardiovascular disease (12). Whereas increased levels of ω -3 LC-PUFAs (and therefore lower ω -6/ ω -3 ratios), found in Mediterranean diets, exert a positive effect on general health (13). In most populations the consumption is either insufficient or not efficient at providing adequate tissue levels of EPA and DHA supporting a strong rationale for increasing ω -3 LC-PUFAs intakes. The Food and Agriculture Organization in collaboration with the World Health Organization (FAO/WHO) recently recommended a combined intake of 250 mg/d of EPA and DHA for adults (14). The Dietary Guidelines of the US 2010 give similar recommendations (15).

LC-PUFA serum levels have become established as a valid biochemical marker for assessing physiological status (16). However, only two studies investigated LC-PUFA serum levels in periodontal disease (17,18). Both studies showed significantly higher blood concentrations of ω -6 LC-PUFAs in patients with periodontitis but showed no significant differences in ω -3 LC-PUFAs concentrations. Our previous study showed that serum levels of both ω -3 and ω -6 LC-PUFAs were higher in patients

with chronic periodontitis. Moreover, significant correlations between mean pocket depth and serum concentrations of both LC-PUFAs were found (19).

The potential therapeutic benefits of dietary supplementation with ω -3 LC-PUFAs have been studied extensively during the last two decades. A recent systematic review showed a fairly consistent, but modest, benefit of ω -3 LC-PUFAs in rheumatic arthritis (20). In inflammatory bowel disease the results are inconsistent (21). In animal models, dietary supplementation with ω -3 LC-PUFAs has been shown to be effective but in humans this remains to be shown (22). Clinical assays have evaluated the relationship between ω -3 LC-PUFA supplementation and periodontal clinical outcomes (6,23–25). Besides the promising clinical effects, little is known about the serum level of ω -3 LC-PUFAs before and after supplementation.

The primary aim of this study was to investigate the impact of periodontal treatment on LC-PUFA serum levels. As a secondary aim, we wanted to assess the effect of a dietary ω -3 supplementation on the clinical outcome of the treatment.

Material and methods

Patient selection

All patients were seeking treatment at the Dental School of the Rio de Janeiro State University (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil. Patients had at least 20 teeth and were diagnosed according to the criteria described by the American Academy of Periodontology (AAP) (26). The participants had no apparent ongoing systemic disease and were not taking any medication that could affect their periodontal conditions. They had not taken antibiotics for at least 6 mo nor had they taken non-steroidal anti-inflammatory drugs for at least 3 mo before starting treatment in this study. Individuals taking LC-PUFA nutritional supplements were excluded. All individuals signed an informed consent before enrollment.

The Ethics Committee of the Pedro Ernesto University Hospital (UERJ, Rio de Janeiro, Brazil) approved the study protocol (2714/2010). Twenty-one patients with generalized chronic periodontitis (seven men and 14 women, mean age 46.0 ± 8.8 years) participated in the study during the period of May to December, 2010. Ten patients with generalized chronic periodontitis (mean age 44 ± 6.4 years) composed the test group and were treated with scaling and root planing (SRP) associated with ω -3 supplementation (3 capsules/d, during 4 mo; Omega-3 supplement; Quintaessencia, Rio de Janeiro, Brazil). The placebo group was composed of 11 patients with generalized chronic periodontitis (mean age 47.9 ± 10.5 years) and received SRP + placebo (3 capsules/d, during 4 mo; Placebo; Quintaessencia). All patients were examined again at 4 mo. This study was considered a pilot randomized controlled double-blind trial.

Omega-3 supplementation

All patients with generalized chronic periodontitis were randomly assigned using a coin toss to receive one of the two treatments. Each supplement capsule provided 1 g of ω -3 (180 mg EPA/120 mg DHA; Omega-3 supplement; Quintaessencia). The patients in the test group were instructed to take three capsules per day leading to a total of 900 mg EPA and DHA per day. The patients in the placebo group received three placebo capsules per day with 450 mg of gelatin (Quintaessencia). Three containers, each one containing 30 capsules, were delivered to participants per month. Compliance was checked by the return of the empty capsule containers and by asking weekly about the supplement intake. The bottles were not decoded until after all the follow-up evaluations and final statistical analyses were completed to ensure a proper double-blind study protocol. Patients also answered a questionnaire about the occurrence of stomach upsets, gastrointestinal disorders or other adverse events, and none were reported.

Food frequency questionnaire and body mass index

The food frequency questionnaire (FFQ) was administered by an experienced nutritionist during a face-to-face interview. The FFQ was recorded at baseline and again at 4 mo for test and placebo groups. The questionnaire is designed to capture the habitual food intake among adults, including questions about 30 food items grouped together according to the Brazilian meal pattern. Items in the FFQ included an extensive list of specific seafood and fish, and walnuts, flaxseed, flaxseed oil, cod liver oil and canola oil. For each item, the categories ranged from never to a number of times in each month, each week or each day. The patients were instructed not to change their diet during the trial. Body mass index was calculated as body weight divided by their height squared (kg/m^2).

Clinical measurements and treatment

The clinical periodontal parameters measured were percentages of sites that bled on probing (BOP), visible plaque index, probing depth and clinical attachment level (CAL). Probing depth and CAL were recorded at six sites per tooth (mesiobuccal, buccal, distobuccal, mesiolingual, lingual and distolingual) except for third molars. A periodontal computerized probe (Florida Probe, Gainesville, FL, USA) was used together with a silicone stent (1 mm plates; Bio Art, São Paulo, Brazil). The measurements were recorded at baseline and again at 4 mo. There was an intra-examiner concordance of 98% within the interval of ± 0.5 mm for probing depth and CAL measurements.

After baseline examinations, patients received non-surgical periodontal treatment, which consisted of oral hygiene instructions and supra- and subgingival debridement (SRP) under local anesthesia. The treatment was performed by an experienced periodontist (GLM) with manual (Gracey and McCall curettes; Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) and ultrasonic

(Cavitron select[®]; Dentsply, York, PA, USA) instruments. On average, the treatment took four 50-min sessions carried out once a week. Reevaluations were performed 4 mo after baseline.

Blood collection

Patients were instructed not to eat for 12 h before sample collection. Blood samples (20 mL) were obtained in the morning (08:00 h) by venous puncture. Four milliliters were transferred to glass tubes containing 7.2 mg K2-EDTA (BD Vacutainer, Franklin Lakes NJ, USA) for glycated hemoglobin and blood count. Another 4 mL were transferred to glass tubes with 6 mg of NaF and 12 mg Na₂ EDTA (BD Vacutainer) for glucose analysis. Eight milliliters were transferred to clot activator glass tubes (BD Vacutainer) for lipid profile, high-sensitivity C-reactive protein, insulin and ω -3 and ω -6 LC-PUFAs (EPA, DHA, DPA and AA). All samples were immediately centrifuged for 5 min, except the K2-EDTA, and used for immediate analysis or stored at -70°C pending analysis. Blood collection was carried out at baseline and after 4 mo.

Laboratory assays

Plasma glucose, triacylglycerols, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, very-low-density lipoprotein cholesterol, glycated hemoglobin, insulin and leukocyte counts were measured using an automatic analyzer from the laboratory routine (DLE Medicina laboratorial, Rio de Janeiro, Brazil). C-reactive protein levels were determined using a highly sensitive immunoturbidimetric assay (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Germany). LC-PUFAs in serum were analyzed after the extraction of lipids and oxidation was prevented by the addition of butylated hydroxytoluene. The organic phase containing total lipids was dried under nitrogen flow, and the residue was methylated. LC-PUFAs in serum were analyzed by gas chromatograph. The identification

and quantification of gas chromatographic peaks of fatty acid methyl esters were performed using a commercial standard (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Statistical analysis

The sample data distribution was available using the Kolmogorov–Smirnov test. Data with normal distribution were presented as mean and standard deviation, while those with non-normally distributed data were presented as median and range. The significance of differences between groups was calculated using unpaired Student's *t*-test and Mann–Whitney *U*-test, accordingly. The significance of differences between groups for gender, race and smoking was tested using Fisher exact test. The significance of changes (Δ) in clinical laboratory biomarkers and LC-PUFA data with time point were determined using the Wilcoxon rank sum test for each group. The significance was determined at 5% ($p < 0.05$) and the statistical analyses were performed using spss v.19.0. (IBM, Chicago, IL, USA).

Results

Demographic data and clinical outcome

The baseline demographic data indicated that both groups were similar regarding age, gender, smoking, race and body mass index (Table 1). The FFQ showed that the estimated intake of ω -3 LC-PUFAs for both groups before the study was lower than the 250 mg/d (DHA + EPA) recommended by the FAO/WHO. Therefore, the groups were considered as homogeneous in relation to the habitual intake of ω -3 LC-PUFAs.

The clinical periodontal parameters, probing depth, CAL, VIP and BOP, were not significantly different between test and placebo groups at baseline (Table 2). There were significant improvements in probing depth and in CAL in both groups after nonsurgical periodontal treatment (Table 2). There was a significant

4 Martínez et al.

Table 1. Demographic data in test and control groups at baseline

Variable	Categories	Test	Placebo
Patients	GCP	10	11
Gender ^a	Male	3	4
	Female	7	7
Age (years; mean \pm SD) ^b		44.0 \pm 6.4	47.9 \pm 10.5
Race ^a	Whites	5	7
	Non-white	5	4
	Smoking ^a	1	1
	Non-smokers	9	10
BMI (mean \pm SD) ^b		28.2 \pm 0.9	28.3 \pm 1.3

BMI, body mass index; GCP, generalized chronic periodontitis.

^aNo differences were found between the test and placebo groups using the Fisher exact test.

^bNo differences were found between the test and placebo groups using the unpaired Student's *t*-test.

Table 2. The median (range) of the percentage of sites from different categories in periodontitis test and placebo groups at baseline and after therapy

Variable	Categories	Time point	Test	Placebo
Probing depth	Shallow (\leq 3 mm)	Baseline	69.5 (46.0)	81.0 (52.0)
		4 mo	92.0 (35.0)	92.0 (31.0)
		Δ	20.5 (27.0)**	14.0 (29.0)**
	Moderate (4–5 mm)	Baseline	20.5 (27.0)	13.0 (32.0)
		4 mo	6.5 (26.0)	6.0 (27.0)
		Δ	-7.0 (35.0)**	-9.0 (30.0)**
	Deep (\geq 6 mm)	Baseline	4.5 (35.0)	6.0 (21.0)
		4 mo	0.5 (9.0)	1.0 (5.0)
		Δ	-3.0 (25.0)**	-4.0 (16.0)**
	0–1 mm	Baseline	57.0 (52.0)	52.0 (60.0)
		4 mo	67.5 (60.0)	64.0 (65.0)
		Δ	9.0 (28.0)**	12.0 (23.0)**
CAL	2–4 mm	Baseline	30.5 (30)	36.0 (47.0)
		4 mo	27.5 (34.0)	26.0 (53.0)
		Δ	-5.0 (37.0)*	-8.0 (22.0)**
	\geq 5 mm	Baseline	11.0 (52.0)	10.0 (24.0)
		4 mo	6.0 (39.0)	5.0 (22.0)
		Δ	-5.0 (13.0)**	-2.0 (11.0)**
VPI (%)	Baseline	61.5 (82.0)	60.0 (81.0)	
	4 mo	50.5 (52.0)	42.0 (78.0)	
	Δ	-9.5 (63.0)	-1.0 (95.0)	
BOP (%)	Baseline	20.06 (58.3)	19.9 (29.5)	
	4 mo	5.5 (23.0)	5.0 (13.0)	
	Δ	-14.0 (81.0)*	-11.0 (32.0)*	

BOP, bleeding on probing; CAL, clinical attachment level; VPI, visible plaque index.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared baseline to 4 mo (Wilcoxon rank sum test).

No differences were found between the test and placebo groups using the Fisher exact test.

reduction in percentage of BOP-positive site in both groups ($p < 0.01$).

Long chain-polyunsaturated fatty acid levels

At baseline and after periodontal treatment, test and placebo groups showed no significant difference in the serum levels of DHA, DPA, EPA and AA. After periodontal treatment, however, the placebo group showed a

significant reduction in DHA, DPA, EPA and AA serum levels ($p < 0.01$) whereas the test group showed a significant reduction only in DPA and AA ($p < 0.01$; Table 3).

Long chain-polyunsaturated fatty acid ratios

At baseline, there were no significant differences between the groups for AA/EPA, AA/DHA and AA/DPA

ratios, whereas after treatment, all ratios analyzed in the test group were significantly lower compared to the placebo group (AA/EPA $p = 0.004$, AA/DHA $p = 0.004$ and AA/DPA $p = 0.02$; Table 4).

The placebo group showed no differences in ratios AA/EPA and AA/DPA at 4 mo compared to baseline, but the ratio AA/DHA increased significantly ($p < 0.05$), whereas in the generalized chronic periodontitis test group, there was a significant reduction in the AA/EPA and AA/DHA ratios ($p < 0.01$). The Δ for ratios AA/EPA and AA/DHA was significantly higher in the test group compared to the placebo group ($p = 0.002$; $p < 0.001$, respectively; Table 4).

Biological blood parameters

Similar biological parameters were observed among the test and placebo groups at baseline, with the exception of significantly lower glucose levels in the placebo group ($p < 0.05$; Table 5). After periodontal therapy, the placebo group showed significantly higher high-density lipoprotein ($p < 0.05$) and insulin ($p < 0.05$) levels, whereas the test group showed significant reduction in glucose levels ($p < 0.05$; Table 5).

Discussion

The present study shows that periodontal treatment reduced serum levels of all analyzed LC-PUFAs in the placebo group, and the fatty acids not included in the dietary supplementation in the test group. To the best of our knowledge this is the first study to monitor serum levels of LC-PUFAs during periodontal treatment. A reduction of LC-PUFAs in serum after treatment is in line with recent findings from a transversal study where LC-PUFAs were significantly correlated with the mean pocket depth (19).

Pocket depth, CAL, and BOP decreased significantly after treatment. Visible plaque also decreased, but not significantly. The reason for this is not clear, but one possible explanation

Table 3. The median (range) serum concentration of long chain-polyunsaturated fatty acids (mg/mL) in periodontitis test and placebo groups at baseline and after therapy

Variable	Time point	Test	Placebo	p Value ^a
DHA (C22:6w3)	Baseline	202.6 (183.0)	220.4 (342.4)	1.000
	4 mo	180.6 (309.6)	97.7 (178.4)	0.139
	Δ	-94.4 (275.2)	-119.7 (322.3)**	0.121
DPA (C22:5W3)	Baseline	49.8 (76.4)	46.2 (58.6)	0.481
	4 mo	26.6 (64.4)	15.8 (35.9)	0.159
	Δ	-22.3 (64.5)**	-24.4 (49.5)**	0.833
EPA (C20:5W3)	Baseline	50.9 (78.3)	51.2 (93.9)	0.944
	4 mo	56.3 (116.0)	23.5 (60.8)	0.057
	Δ	-4.8 (133.9)	-34.0 (83.9)**	0.181
AA (C20:4w6)	Baseline	1009.1 (845.4)	899.6 (943.3)	0.698
	4 mo	338.9 (668.0)	531.1 (818.8)	0.360
	Δ	-538.8 (1134.5)**	-456.5 (1078.5)**	0.573

AA, arachidonic acid; DHA, docosahexaenoic acid; DPA, docosapentaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid.

^aComparison test and placebo groups using Mann-Whitney *U* Test.

*p < 0.05; **p < 0.01 compared baseline to 4 mo (Wilcoxon rank sum test).

Table 4. The ratios (median and range) between ω-6 and ω-3 long chain-polyunsaturated fatty acids in periodontitis test and placebo groups at baseline and after therapy

Variable	Time point	Test	Placebo	p Value ^a
AA/EPA	Baseline	21.6 (22.2)	17.6 (22.0)	0.439
	4 mo	12.8 (9.7)	22.3 (21.5)	0.004
	Δ	-8.2 (23.4)**	3.9 (19.0)	0.002
AA/DHA	Baseline	4.5 (4.2)	3.6 (3.4)	0.159
	4 mo	2.6 (2.4)	3.9 (3.4)	0.004
	Δ	-1.5 (3.0)**	0.3 (1.9)*	< 0.001
AA/DPA	Baseline	17.8 (24.2)	20.2 (30.1)	0.260
	4 mo	17.1 (16.1)	23.0 (22.8)	0.020
	Δ	-2.2 (27.0)	1.5 (24.2)	0.205

AA, arachidonic acid; DHA, docosahexaenoic acid; DPA, docosapentaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid.

^aComparison test and placebo groups using Mann-Whitney *U*-test.

*p < 0.05; **p < 0.01 compared baseline to 4 mo (Wilcoxon rank sum test).

could be that the participants lost interest in oral hygiene towards the end of the observation period. A longer trial period with high plaque index could have increased the BOP, which did not happen in the present study.

Ω-3 PUFAs have been shown to have anti-inflammatory properties that could be beneficial in the treatment of chronic inflammation such as periodontitis (11). Moreover, the resolution of inflammation might be a therapeutic target during periodontal treatment associated with ω-3 LC-PUFA supplementation. This study, however, failed to show any difference between test and placebo groups after non-surgical treatment. The potential therapeutic benefits of

dietary supplementation with ω-3 LC-PUFAs have aroused great interest, but the results are contradictory. Rosensteina *et al.* (24) studied the clinical effect of dietary supplementation with ω-3 or ω-6 LC-PUFAs, or a combination of both, without any periodontal treatment. That study showed a significant decrease of gingival index and pocket depth after supplementation with ω-6, while ω-3 had no significant effect. Campan *et al.* (23) gave ω-3 LC-PUFAs to persons having experimental gingivitis to enhance resolution of inflammation. The study failed to show a difference between the ω-3 LC-PUFAs and placebo capsules. On the other hand, El-Sharkawy *et al.* (6) evaluated the effect of ω-3 LC-PUFA

supplementation associated with low doses of aspirin as an adjunct to scaling and found significant reductions in pocket depth and clinical attachment gain after 3 and 6 mo compared to controls. Similarly, Elkhoulil (25) showed better healing of furcation defects after supplementation with ω-3 LC-PUFAs and low-dose aspirin. It is difficult to interpret the two latter studies as the ω-3 LC-PUFAs are combined with aspirin. When aspirin is taken together with ω-3 LC-PUFAs, the ω-3 is metabolized into resolving molecules, aspirin-triggered lipoxin and resolving compounds that are longer-lasting and more potent than endogenous resolvins and lipoxins (27).

Ω-3 supplementation seems to increase LC-PUFA levels in serum. Tong *et al.* (28) observed that healthy patients supplemented with 3 g/d of fish oil for 4 wk showed 6.5 times higher EPA levels compared to a placebo group and DPA levels 2.2 times higher compared to a placebo group, while DHA levels did not differ between groups. Moreover, Dawczynski *et al.* (29) showed that ω-3 LC-PUFA supplementation significantly increased the serum levels of DHA and EPA in women with rheumatoid arthritis. The present study showed that DHA and EPA supplementation sustained the levels of these LC-PUFAs, while non-supplemented patients showed a significant decrease. Moreover, as ω-3 and ω-6 LC-PUFAs contribute to the pro-inflammatory and pro-resolution phase, it is also reasonable that such levels return to basal physiological status (cataplasia) (30).

The AA/EPA ratio at baseline in the present study was high (20 : 1) compared with those found in populations with a Mediterranean diet (16,31–33), whereas after treatment, all ratios analyzed in the test group were significantly lower compared to placebo group, reaching ratios close to those found in populations with a Mediterranean diet (34). High ω-3 dietary intake is known as the primary factor directly related to LC-PUFA serum levels (33,35) and interferes in the serum ratio between

6 Martinez et al.

Table 5. Median serum concentrations (range) for biological parameters in periodontitis test and placebo groups at baseline and after therapy.

Variable	Time point	Test	Placebo
Triglyceride (mg/dL)	Baseline	91.5 (176.0)	95.0 (193.0)
	4 mo	84.0 (203.0)	121.0 (139.0)
Cholesterol (mg/dL)	Baseline	210.0 (173.0)	198.0 (108.0)
	4 mo	207.5 (108.0)	188.0 (84.0)
HDL (mg/dL)	Baseline	44.5 (58.0)	42.0 (34.0)
	4 mo	47.5 (55.0)	46.0 (44.0)*
LDL (mg/dL)	Baseline	133.5 (114.0)	119.0 (92.0)
	4 mo	131.0 (82.0)	118.0 (69.0)
VLDL (mg/dL)	Baseline	18.5 (35.0)	19.0 (38.0)
	4 mo	16.5 (40.0)	24.0 (28.0)
hsCRP (mg/dL)	Baseline	0.1 (1.0)	0.1 (1.4)
	4 mo	0.2 (0.6)	0.3 (1.4)
Leucocytes (/mm ³)	Baseline	6320.0 (7280.0)	6760.0 (5490.0)
	4 mo	5650.0 (9170.0)	7050.0 (7670.0)
Glycated hemoglobin (%HbA1c)	Baseline	5.5 (1.5)	5.5 (1.0)
	4 mo	5.6 (1.6)	5.6 (0.9)
Insulin (μ UI/mL)	Baseline	6.5 (13.1)	3.5 (13.2)
	4 mo	7.7 (12.9)	11.3 (21.0)*
Glucose (mg/dL)	Baseline	102.5 (22.0)	98.0 (38.0) [†]
	4 mo	96.0 (28.0)*	96.0 (31.0)

HDL, high-density lipoprotein; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; LDL, low-density lipoprotein; VLDL, very-low-density lipoprotein.

*p < 0.05 compared baseline to 4 mo (Wilcoxon rank sum test).

[†]p < 0.05 compared the groups test and placebo at baseline and after 4 mo (Mann-Whitney U-test).

ω -3 and ω -6 (36,37). The ω -3 dietary intake in most populations, mainly those with a Western diet, is either insufficient or not efficient at providing adequate available body EPA and DHA levels. Our FFQ showed the estimated amount of ω -3 LC-PUFA intake for the studied groups was lower than 250 mg/d (DHA + EPA), as recently recommended by the FAO/WHO for adults (14) and the 2010 Dietary Guidelines of the USA (15).

In conclusion, periodontal treatment reduced serum levels of all analyzed LC-PUFAs, except the fatty acids included in the dietary supplementation. The ω -3 dietary supplementation did not have an effect on the clinical outcome of the treatment. This preliminary study does not support the notion that combining periodontal treatment with dietary supplementation enhances healing.

References

- Golub LM, Ryan ME, Williams RC. Modulation of the host response in the

treatment of periodontitis. *Dent Today* 1998;17:102–106, 108–9.

- Gu Y, Lee HM, Sorsa T, Simon SR, Golub LM. Doxycycline inhibits mononuclear cell-mediated connective tissue breakdown. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010;58:218–225.
- Badran Z, Kraehenmann MA, Guicheux J, Soueidan A. Bisphosphonates in periodontal treatment: a review. *Oral Health Prev Dent* 2009;7:3–12.
- Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol* 2000 2006;40:144–163.
- Novak MJ, Johns LP, Miller RC, Bradshaw MH. Adjunctive benefits of subantimicrobial dose doxycycline in the management of severe, generalized, chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002;73:762–769.
- El-Sharkawy H, Aboelsaad N, Eliwa M et al. Adjunctive treatment of chronic periodontitis with daily dietary supplementation with omega-3 fatty acids and low-dose aspirin. *J Periodontol* 2010;81:1635–1643.
- Racine RA, Deckelbaum RJ. Sources of the very-long-chain unsaturated omega-3 fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:123–128.
- Sijben JW, Calder PC. Differential immunomodulation with long-chain n-3

PUFA in health and chronic disease. *Proc Nutr Soc* 2007;66:237–259.

- Sonestedt E, Ericson U, Gullberg B, Skog K, Olsson H, Wirfält E. Do both heterocyclic amines and omega-6 polyunsaturated fatty acids contribute to the incidence of breast cancer in postmenopausal women of the Malmö diet and cancer cohort? *Int J Cancer* 2008;123:1637–1643.
- Khanaki K, Nouri M, Ardekani AM et al. Evaluation of the relationship between endometriosis and omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Iran Biomed J* 2012;16:38–43.
- Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation an autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 2002;21:495–505.
- Hayakawa S, Yoshikawa D, Ishii H et al. Association of plasma omega-3 to omega-6 polyunsaturated fatty acid ratio with complexity of coronary artery lesion. *Intern Med* 2012;51:1009–1014.
- Simopoulos AP. Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects. *World Rev Nutr Diet*. 2003;92:1–22.
- Fats and fatty acids in human nutrition. Proceedings of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. November 10–14, 2008. Geneva, Switzerland. *Ann Nutr Metab* 2009;55:5–300.
- McGuire S. U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services, dietary guidelines for Americans, 2010, 7th edition. Washington, DC: U.S. Government Printing Office. *Adv Nutr* 2011;2:293.
- Kobayashi M, Sasaki S, Kawabata T, Hasegawa K, Akabane M, Tsugane A. Single measurement of serum phospholipid fatty acid as a biomarker of specific fatty acid intake in middle-aged Japanese men. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:643–650.
- Requirand P, Gibert P, Trimini P, Cristol JP, Descomps B. Serum fatty acid imbalance in bone loss: example with periodontal disease. *Clin Nutr* 2000;19:271–276.
- Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, Battino M et al. Periodontitis is associated with altered plasma fatty acids and cardiovascular risk markers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20:133–139.
- Figueredo CM, Martinez GL, Koury JC, Fischer RG, Gustafsson A. Serum levels of long-chain polyunsaturated fatty acids in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 2013;84:675–682.
- Miles EA, Calder PC. Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *Br J Nutr* 2012;107:S171–S184.

21. Cabré E, Domènech E. Impact of environmental and dietary factors on the course of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2012;**18**:3814–3822.
22. Kesavalu L, Vasudevan B, Raghu B *et al.* Omega-3 fatty acid effect on alveolar bone loss in rats. *J Dent Res* 2006;**85**:648–652.
23. Campan P, Planchand P, Duran D. Pilot study on n-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of human experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* 1997;**24**:907–913.
24. Rosensteina ED, Kushner LJ, Kramer N, Kazandjian G. Pilot study of dietary fatty acid supplementation in the treatment of adult periodontitis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;**68**:213–218.
25. Elkhoul AM. The efficacy of host response modulation therapy (omega-3 plus low-dose aspirin) as an adjunctive treatment of chronic periodontitis (clinical and biochemical study). *J Periodontal Res* 2011;**46**:261–268.
26. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;**4**:1–6.
27. Arita M, Clish CB, Serhan CN. The contributions of aspirin and microbial oxygenase to the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: novel oxygenase products from omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;**338**:149–157.
28. Tong H, Rappold AG, Diaz-Sanchez D *et al.* Omega-3 fatty acid supplementation appears to attenuate particulate air pollution induced cardiac effects and lipid changes in healthy middle-aged adults. *Environ Health Perspect* 2012;**120**:952–957.
29. Dawczynski C, Schubert R, Hein G *et al.* Long-term moderate intervention with n-3 long-chain PUFA-supplemented dairy products: effects on pathophysiological biomarkers in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Nutr* 2009;**101**:1517–1526.
30. Serhan CN, Hong S, Gronert K *et al.* Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter pro-inflammation signals. *J Exp Med* 2000;**196**:1025–1037.
31. Hirai K, Horiuchi R, Ohno Y, Higuchi H, Asano Y. Lower eicosapentaenoic acid and higher arachidonic acid levels in Sera of young adults in the Netherlands than in Japan. *Environ Health Prev Med* 2000;**5**:60–65.
32. Kuriki K, Nagaya T, Tokudome Y *et al.* Plasma concentrations of (n-3) highly unsaturated fatty acids are good biomarkers of relative dietary fatty acid intakes: a cross-sectional study. *J Nutr* 2003;**133**:3643–3650.
33. Baylin A, Kim MK, Donovan-Palmer A *et al.* Fasting whole blood as a biomarker of essential fatty acid intake in epidemiologic studies: comparison with adipose tissue and plasma. *Am J Epidemiol* 2005;**162**:372–381.
34. Gebauer SK, Psota TL, Harris WS, Kris-Etherton PM. n-3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr* 2006;**83**:1526S–1535S.
35. Baylin A, Campos H. The use of fatty acid biomarkers to reflect dietary intake. *Curr Opin Lipidol* 2006;**17**:22–27.
36. Rizzo AM, Montorfano G, Negroni M *et al.* A rapid method for determining arachidonic:eicosapentaenoic acid ratios in whole blood lipids: correlation with erythrocyte membrane ratios and validation in a large Italian population of various ages and pathologies. *Lipids Health Dis* 2010;**27**:7.
37. Dawczynski C, Hackermeier U, Viehweger M, Stange R, Springer M, Jahreis G. Incorporation of n-3 PUFA and γ -linolenic acid in blood lipids and red blood cell lipids together with their influence on disease activity in patients with chronic inflammatory arthritis – a randomized controlled human intervention trial. *Lipids Health Dis* 2011;**4**:130.

APÊNDICE C - Manuscrito III- Osteoclastogenesis related cytokines and alveolar optical density in periodontal disease

Osteoclastogenesis related cytokines and alveolar optical density in periodontal disease

Key words: alveolar bone, cytokines, omega-3, periodontal disease, radiography

Short title: Cytokines and density in disease onset and damage

Abstract

The clinical diagnosis of periodontitis is based on assessment of irreversible tissue destruction and means to diagnose disease onset and activity are lacking. The aim of this study was to assess the expression of a panel of osteoclastogenesis related cytokines in gingival crevicular fluid (GCF) of inflamed sites of gingivitis and periodontitis patients and sites with progressed bone destruction in periodontitis patients, and to relate the cytokine expression to the alveolar optical density. The secondary aim was to investigate the effect of non-surgical periodontal treatment with and without omega (ω)-3 supplementation on the bone optical density and the cytokine expression in GCF of periodontitis patients. GCF of fifteen gingivitis-control sites, 20 non-destroyed and 20 destroyed sites from periodontitis patients was analyzed for Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANK-L), osteoprotegerin (OPG), osteocalcin (OC), tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-1 β , IL-4, IL-6 and IL-10 using multiplexed bead immunoassay. The periodontitis sites were further subdivided into mineralized and demineralized sites based on assessment of the alveolar optical density of digital intra-oral radiographs. Periodontitis patients were randomized double blindly into scaling and root planing plus ω -3 supplementation (SRP+ ω -3) or placebo (SRP+placebo), and were reevaluated after four months for osteoclastogenesis related cytokines in GCF and alveolar optical density. The GCF of control gingivitis sites were lower in IFN- γ , IL-4, IL-10, RANK-L and OC compared to non-destroyed and destroyed periodontitis sites, and IL-1 β , IL-6 and OPG compared to destroyed periodontitis sites. Periodontitis patients had lower IL-1 β and OPG in non-destroyed compared to destroyed sites. Demineralized destroyed sites had significantly higher RANK-L, IL-6 and IL-10, whereas IL-1 β was lower compared to mineralized sites. Demineralized non-destroyed sites were significantly higher in OPG, OC and the ratio RANK-L/OPG compared to mineralized sites. No changes in the alveolar optical density of non-destroyed or destroyed sites were found after treatment in either group. Treatment of SRP+ ω -3 resulted in an increase in IL-4 and a decrease in OC, IFN- γ and IL-10. In conclusion, osteoclastogenesis related cytokines in GCF reflect periodontal severity and differ with altered alveolar optical density, suggesting the use of optical density as a surrogate to diagnose periodontal damage. This could improve the classification and lead to more individualized therapeutic interventions. Ω -3 supplementation did not improve the outcome of non-surgical periodontal treatment.

Introduction

Periodontal diseases, gingivitis and periodontitis, are characterized by an inflammatory response of tooth supporting structures to the bacterial biofilm on tooth surfaces. [Kinane et al 2001] The inflammation is marginally restricted in gingivitis, whereas periodontitis is characterized by irreversible tissue destruction and loss of periodontal ligament and alveolar bone. [Page and Kornman 1997; Socransky et al 1984] In some individuals gingivitis never progress to periodontitis [Kinane 2001] however, the fact that periodontitis always is preceded by gingivitis suggests hyper inflammatory reactions or aberrant host-responses. Although several studies have characterized differences in local inflammatory responses in gingivitis and periodontitis, few have related that to changes in the alveolar bone density [Barros et al 2014; Szewczyk et al 2013; Reinhardt et al 2010; Rosa et al 2008, Hwang et al 2008], and diagnosis of periodontitis is based on clinical measurements of irreversible tissue destruction whereas diagnosis of disease onset and disease activity is still lacking.

Periodontal inflammation shares several pathogenic features of other inflammatory diseases including rheumatoid arthritis (RA). The inflammatory process involves local infiltration of leukocytes that, along with resident cells, release a range of inflammatory mediators that mediate destruction of soft and hard tissues including alveolar bone. Radiographic evaluations of bone erosion reflect the bone turnover; the difference in bone formation and resorption. Until now, bone density assessments are rarely used to diagnose or evaluate periodontal diseases whereas these constitute a central feature and classification criteria in RA diagnosis, reflective of disease activity and inflammation which contributes to the identification of patients with progressing disease or remission. [Hoff et al 2009; van der Heijde et al 2013; Haavardsholm et al 2008; McQueen et al 2003]

Cytokines including tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , and IL-6 are central to the pathogenesis of bone destruction by induction of Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) that differentiate myeloid progenitors into bone-resorbing osteoclasts, or by directly independently of RANKL stimulate osteoclast differentiation. TNF- α , IL-1 β , and IL-6, are up regulated in RA [Brennan and McInnes 2008] and in periodontitis measured locally in gingival crevicular fluid (GCF). [Graves 2008] Identification of potential surrogate biomarkers related to the bone damage is important as they may predict disease prognosis, decrease the risk to misclassification and explain unjustified treatment. In RA

erosion and biomarkers such as anticitrullinated protein antibodies and rheumatoid factor that predict or reflect bone erosion [Hecht et al 2014; de Vries-Bouwstra et al 2008; Alarcon et al 2015] are part of RA criteria however, in periodontitis classification criteria of bone erosion and related biomarkers is until now lacking. Identification of such markers could prompt more individualized therapeutic interventions by clinicians that further suppress bone destruction besides conventional therapy.

Fatty acids are major components of all cell membranes and precursors of signaling molecules derived from naturally occurring dietary constituents. [Hannun and Obeid 2008] The potential modulatory role of omega-3 (ω -3), including eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), on inflammation and bone destruction has been assessed in RA where ω -3 supplementation decrease circulating IL-1 β [Kremer et al 1995], TNF- α and RANK-L [Kolahi et al 2010] and decrease the IL-1 production by monocytes. [Kremer et al 1990] At least in part, ω -3 has an inhibitory effect on the transcription factor nuclear factor Kappa β (NF κ B) [Siriwardhana et al 2012] leading to subsequent downregulation of TNF- α and suppression of macrophage colony-stimulating factor and RANKL in the early stages of osteoclastogenesis. [Nakanishi et al 2013] Ω -3 can further reduce the activity and number of osteoclasts without altering the activity and number of osteoblasts [Nakanishi et al 2013], increase bone formation markers, such as bone specific alkaline phosphatase, and improve bone mineral density. [Kruger et al 1998] Epidemiological evidence suggests that diets high in ω -3 may be beneficial for skeletal health and studies have reported favorable effects of ω -3 on bone mineral density or bone turnover markers. [Watkins et al 2001] Experimental periodontitis show less alveolar bone resorption in mice treated with ω -3 supplementation. [Kesavalu et al 2006] Addition of ω -3 supplementation in humans following periodontal surgery result in decreased IL-1 β and increased IL-10 expression in GCF. [Elkhouli 2011] Until now, studies on the impact of ω -3 supplementation together with non-surgical therapy on the alveolar bone and GCF cytokines are lacking.

The aim of this study was to assess the expression of a panel of osteoclastogenesis related cytokines in GCF of inflamed sites of gingivitis and periodontitis patients and sites with progressed bone destruction in periodontitis patients, and to relate the cytokine expression to the optical density. The secondary aim was to investigate the effect of non-surgical periodontal treatment with and without ω -3 supplementation on the bone optical density and the cytokine expression in GCF in chronic periodontitis patients.

Materials and methods

Study group

Adults, over 18 years, with generalized chronic periodontitis (GCP) seeking treatment at the dental school of the Rio de Janeiro State University (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil between 2010 and 2011 were eligible for inclusion. An experienced specialist in periodontology diagnosed patients according to the criteria of the American Academy of Periodontology (AAP). The inclusion criteria were: having moderate-severe periodontitis (attachment loss ≥ 3 mm and periodontal pocket ≥ 5 mm) in at least 4 interproximal sites from different teeth, and having at least 15 own teeth. The exclusion criteria were: diagnosed systemic disease, the use of antibiotics or non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the previous 6 and 3 months respectively, ongoing use of medication known to affect periodontal condition such as anticonvulsants (phenytoin) or immunosuppressives (cyclosporine, nifedipine, nitrendipine, oxidipine, felodipine, amlodipine, verapamil and diltiazem), ongoing use of omega nutritional supplements, or previous periodontal and/or orthodontic treatment in the last 12 months. A group of plaque induced-gingivitis patients was used as controls. The inclusion criteria for the gingivitis subjects were: at least 20 own teeth with no interproximal attachment loss and presence of bleeding in $\geq 30\%$ of sites. The same exclusion criteria as for periodontitis subjects were applied. The Ethics Committee of the Pedro Ernesto University Hospital (UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) approved the study (protocol 2714/2010) and informed written consent was received by all participants.

Periodontal measurements and site selection

Periodontal examination included bleeding on probing (BOP), O'Leary's plaque index (PI), probing depth (PD), and clinical attachment level (CAL). The PD and CAL were recorded at 6 sites per tooth (mesio-buccal, mid-buccal, disto-buccal, mesio-lingual, mid-lingual, and disto-lingual), excluding the third molars, using a periodontal computerized probe (Florida Probe, Gainesville, FL, USA). The intra-examiner concordance was 98% within the interval of ± 0.5 mm for PD and CAL. An interproximal inflamed site, defined by redness, swelling, or bleeding upon stimulation, without destruction of soft or hard (gingiva, alveolar bone) periodontal tissue in any surface of the tooth, and without marginal dental restorations/appliances or carious cavity, was selected from each subject, referred to as control/ non-destroyed site (PD ≤ 3 mm, CAL ≤ 1 mm) in the gingivitis and periodontitis group, respectively. In the GCP group, a site from a tooth with severe destruction of soft and

hard periodontal tissue was selected, referred to as destroyed site ($PD \geq 4$ mm, $CAL \geq 2$ mm). In total 15 control sites from gingivitis patients, 20 non-destroyed and 20 destroyed sites from the GCP group were collected.

Alveolar optical density and height

The alveolar optical density (pixels/mm²) in the interproximal standard regions of interest (ROI) and height of the distance between cementum enamel junction and alveolar bone crest (mm) were assessed through digital intra-oral radiographs as previously described [Rosa et al 2008], using the Kodak Digital Radiography System RVG 6100 (Rochester, NY, USA). The KODAK Intra-Oral 2200 X-ray apparatus was used (Rochester, NY, USA) and radiographs were captured at 70kV, 7 mA and adjusted to factor 3 with an exposure time for each region from the dental arch according to the manufacturer. All measures of protection against ionizing radiation, recommended in the literature were respected. The interproximal standard ROI was drawn using a metal grid with several 1.0mm² squares, attached to the sensor (KODAK, Rochester, NY, USA) (Figure 1A). The location of ROIs did not overlap any portion of the tooth surface, periodontal ligament or lamina dura. The ROI 1 was placed in the most coronal portion of the alveolar bone crest, and the control ROI (ROI 2) was placed 5 mm apical to ROI 1. The difference in the alveolar optical density between ROI 1 – ROI 2 (Δ ROI 1-2) represent the presumable mineralization (positive pixels) / demineralization (negative pixels) of the alveolar bone crest for each site. The alveolar optical height, defined by the distance from the cemento-enamel junction to the alveolar bone crest, was measured in millimeters (Figure 1A). The radiographic evaluations were performed by two calibrated examiners (GLM and FB) with 99% concordance within ± 5 pixels for alveolar optical density in ROI and ± 0.1 mm for the alveolar optical height.

Gingival crevicular fluid collection

Gingival crevicular fluid was collected between 8h and 12h as previously described [Figueredo and Gustafsson 1998]. Briefly, supragingival plaque was carefully removed and the sites sampled were isolated using cotton rolls and dried gently with an air syringe. Samples were collected using the Fill-Master® type 251 device (Delta Scientific Medical, Haandvaerkerparken, Store Hedinge, Denmark), adapted for controlled release of phosphate-buffered-saline (PBS), and connected to the unit aspirators. Samples were collected into tubes with 500 μ L PBS, centrifuged at 3,000xg for 5 min whereupon supernatants were separated from the pellet and frozen at -80°C until analysis. The GCF collection was performed one

week after the radiographs were taken and analyzed in order to select collection sites based on the radiographic image.

Immunoassay

Measurements of a panel of cytokines and chemokines in GCF were performed using a Luminex 200 analyzer (Alameda, CA, USA) with Milliplex kits (Millipore, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. 50 μ L of GCF was used to analyze the levels of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, interferon (IFN)- γ , osteocalcin (OC), osteoprotegerin (OPG) and RANK-L. Briefly, microsphere beads coated with monoclonal antibodies were added followed by incubation of samples and standards overnight at 4°C. Secondary antibodies were incubated 1h followed by 30 min incubation with streptavidin R-phycoerythrin conjugate. After thorough washing, sheath fluid was added, and microspheres were analyzed in a bead analyzer. GCF concentrations were calculated from the standard curve by Milliplex Analyst software (Milliplex, Billerica, MA, USA), and the levels expressed as pg/mL.

Omega-3 intervention and study procedures

Periodontitis patients were randomized using a coin toss into 4 months supplementation with ω -3 or placebo in a parallel double-blinded design. All patients received non-surgical periodontal treatment which consisted of oral hygiene instructions and supra- and sub-gingival scaling and root planing (SRP) under local anesthesia. The treatment was performed by an experienced periodontist (GLM) with manual (Gracey and McCall cures, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) and ultrasonic (Cavitron select, Dentsply, York, PA, USA) instruments. On average, the treatment required four 50 min sessions. The intervention group received ω -3 dietary supplementation (3 capsules of 300 mg ω -3 (180 mg EPA/120 mg DHA)/ day), and the control group received placebo (3 capsules of 450 mg gelatin/ day) (Quintaessencia, Rio de Janeiro, Brazil). Patients of both groups received three containers of 30 capsules/ month. Compliance was assessed by the return of empty containers, and assessed weekly at visits to the clinic or by telephone calls. The bottles were not decoded until follow-up evaluations and analyses had been performed to ensure a proper double-blind study protocol.

Data handling and statistical analysis

Categorical data on gender and race were tested using Fisher exact test, and smoking and metabolic status tested using Pearson Chi-square test. Differences between groups were

determined by Mann-Whitney U Test, and within groups, when comparing different sites and before and after therapy/intervention, using Wilcoxon signed-rank test. Means were standardized for potential confounders when appropriate, described in the footnotes of tables and figures using the general linear model (GLM) procedure with analysis of covariance (ANCOVA). The Spearman correlation coefficients were calculated between clinical periodontal parameters and GCF concentrations of inflammatory markers. For analyses SPSS (version 19.0; IBM Corporation, Armonk, NY, USA) was used. Data presented as means \pm standard deviation (SD). The significance levels were set to $p < 0.05$ (*), 0.01 (**) or 0.001 (***).

Results

Clinical and optical characteristics of control, non-destroyed and destroyed sites from gingivitis and periodontitis patients

Characteristics of patients with periodontitis and gingivitis are presented in Table I. There was no difference in the proportion of men, women or race between groups, but patients with periodontitis were approximately 15 years older and tended to have a higher proportion of smokers. In accordance with the inclusion criteria, periodontitis patients had significantly lower number of own teeth and higher number of teeth with interproximal PD ≥ 5 mm and CAL ≥ 3 mm. The PI was significantly higher in the periodontitis group whereas the proportion of surfaces with BOP was similar between groups.

We evaluated the periodontal clinical and optical characteristics of control sites in gingivitis and non-destroyed and destroyed sites in periodontitis. There were no difference in PD and CAL between control gingivitis (2.4 ± 0.6 ; 0.3 ± 0.5) and non-destroyed periodontitis sites (2.6 ± 0.5 ; 0.6 ± 0.5), whereas PD and CAL of destroyed periodontitis sites (6.1 ± 1.3 ; 4.8 ± 1.6 , respectively) were significantly increased compared to control gingivitis and non-destroyed periodontitis sites ($p \leq 0.001$, for both). The alveolar optical height was higher in destroyed periodontitis sites compared to control gingivitis and non-destroyed periodontitis sites, and there was a tendency to increased height in non-destroyed periodontitis compared to control gingivitis sites, however when adjusting for age and gender this did not reach statistical significance (Fig 1B). PD and CAL were positively correlated ($p \leq 0.001$; $r = 0.9$) and the alveolar optical height correlated positively to PD and CAL ($p \leq 0.001$; $r = 0.7$).

The sites were sub classified into mineralized and demineralized sites. Demineralized sites (black bars, Fig 1C) were observed in gingivitis (53%), non-destroyed (68%) and destroyed (68%) periodontitis sites. The mean alveolar optical density (values above bars, Fig 1C), was significantly lower in demineralized compared to mineralized sites in all groups ($p \leq 0.001$). Optical density in periodontitis patients was higher in mineralized (grey bars, Fig 1C) destroyed compared to non-destroyed sites ($p \leq 0.05$).

Cytokines in GCF of control, non-destroyed and destroyed sites from gingivitis and periodontitis patients

We analyzed the levels of inflammatory and bone-related markers in GCF of control gingivitis sites, and non-destroyed and destroyed sites in periodontitis patients. IL-8, IL-10, RANK-L and OPG were measurable in 90-100% of all sites whereas the detection frequency of IL-1 β (67-65-100%, $p=0.010$), IL-6 (53-70-95%, $p=0.016$), IFN- γ (40-80-90%, $p=0.001$), OC (20-60-75%, $p < 0.001$), TNF- α (13-20-35%, $p=0.292$), and IL-4 (0-40-65%, $p=0.001$) differed between control gingivitis sites and non-destroyed and destroyed periodontitis sites (respectively - %).

The GCF of control gingivitis sites were lower in IFN- γ , IL-4, IL-10, RANK-L and OC compared to non-destroyed and destroyed periodontitis sites (Fig 2B, E, F, H, J), and IL-1 β , IL-6 and OPG compared to destroyed periodontitis sites (Fig. 2A, D, I). When adjusting for age and gender RANK-L of control gingivitis sites compared to non-destroyed and destroyed periodontitis sites, OC compared to non-destroyed periodontitis sites, and OPG compared to destroyed periodontitis sites did not reach statistical significance (Fig. 2H, J, I, in parenthesis), whereas IL-1 β and IL-6 became significantly lower in control gingivitis sites compared to non-destroyed periodontitis sites (Fig. 2A, D). There were no differences in IL-8, TNF- α or RANK-L/OPG between control gingivitis, non-destroyed and destroyed periodontitis sites (Fig 2C, G, K) whereas periodontitis patients had lower IL-1 β and OPG in non-destroyed compared to destroyed sites (Fig 2A, I). PD and CAL were positively correlated to OPG ($p=0.01$, $r=0.3$), OC ($p=0.01$, $r=0.4$; and $p=0.02$, $r=0.4$, respectively), IFN- γ ($p=0.02$, $r=0.3$; and $p=0.03$, $r=0.3$, respectively), IL-10 ($p=0.002$, $r=0.4$; and $p=0.003$, $r=0.4$, respectively), IL-1 β ($p \leq 0.001$, $r=0.7$), IL-4 ($p=0.01$, $r=0.4$) and IL-6 ($p=0.001$, $r=0.4$). RANK-L was positively correlated to CAL ($p=0.05$, $r=0.3$), and OC and IL-1 β to the bone optical height ($p \leq 0.001$, $r=0.6$) in all subjects.

Cytokines in GCF of mineralized and demineralized non-destroyed and destroyed sites from periodontitis patients

To assess the relation between cytokines in GCF and the optical density we further analyzed cytokine levels with respect to mineralization or demineralization in sites of periodontitis patients. Demineralized destroyed sites had significantly higher RANK-L, IL-6 and IL-10 (Fig. 2L, N, O), whereas IL-1 β was lower (Fig. 2M) compared to mineralized sites. Demineralized non-destroyed sites were significantly higher in OPG, OC and the ratio RANK-L/OPG compared to mineralized sites (Fig. 2P, Q, R). The alveolar optical density was negatively correlated to PD ($p=0.04$, $r=-0.6$), OPG ($p=0.01$, $r=-0.4$), IL-6 ($p=0.03$, $r=-0.4$) and TNF- α ($p=0.03$, $r=-0.4$) in demineralized sites. There were no differences in the other analyzed cytokines between demineralized and mineralized sites of periodontitis patients and there were no differences in any of the analyzed cytokines between mineralized and demineralized sites in gingivitis patients (data not shown).

Clinical and optical changes of non-destroyed and destroyed sites from periodontitis patients following non-surgical treatment with omega-3 supplementation versus placebo

To assess the impact of ω -3 supplementation on periodontal health we randomized periodontitis patients into supplementation with ω -3 or placebo combined with non-surgical periodontal treatment and evaluated periodontal clinical and optical measurements after 4 months. At baseline after randomization, there were no differences in PD, CAL, BOP, or PI between the two treatment groups. Following treatment, PD, CAL, and BOP improved significantly in both groups however no significant differences were observed between patients receiving ω -3 or placebo (Supplement Table 1).

We further analyzed clinical and optical changes in non-destroyed and destroyed sites separately. At baseline, there were no differences in PD of non-destroyed and destroyed sites between the ω -3 and placebo group. Following treatment, PD improved significantly in non-destroyed and destroyed sites of both groups compared to baseline with no significant differences between patients receiving ω -3 or placebo (Fig 3A, D). CAL was at baseline higher in the destroyed sites of the ω -3 group (Fig 3E). Following treatment CAL improved in the destroyed sites of both groups compared to baseline, and CAL remained higher in destroyed sites of the ω -3 group compared to placebo (Fig 3B, E). No changes in the alveolar optical density of non-destroyed or destroyed sites were found after treatment in either group (Fig 3C, F). Taken together, clinical changes of non-destroyed and destroyed sites were not

further improved by either ω -3 supplementation or placebo in addition to non-surgical periodontal treatment.

Cytokine changes in GCF of non-destroyed and destroyed sites from periodontitis patients following non-surgical treatment with omega-3 supplementation versus placebo

We further assessed the impact of non-surgical periodontal treatment with and without ω -3 supplementation on cytokine levels in GCF. IL-8, IL-10, RANK-L and OPG were measurable in 90-100% of non-destroyed and destroyed sites periodontitis patients at baseline and after treatment. In non-destroyed sites, baseline IL-8 and TNF- α were higher in the placebo compared to ω -3 group (Fig 4C, I). Treatment resulted in an increase in IL-4 and a decrease in OC of the ω -3 group (Fig 4D and E), a decrease in IL-6 of both groups (Fig 4H), and a decrease in IL-8 of the placebo group (Fig 4C). The reduction percentages of sites measurable after treatment to OC were 40-20%, IFN- γ 20%, IL-6 70-60%, and the raise percentage of sites measurable to IL-4 were 30-10% in ω -3 and placebo group, respectively. IL-1 β in measurable sites reduced 30% in ω -3 group, and raised 10% in placebo group, TNF- α in measurable sites raised 20%, in ω -3 group, and reduced 10% in placebo group.

After the treatment, in destroyed sites, IL-4 increased whereas INF- γ and IL-10 decreased significantly in ω -3 group (Fig 4N, L, P), IL-1 β , IL-8, IL-6 and OPG decreased significantly in both groups (Fig 4K, M, R, T). OC reduced significantly in placebo compared to ω -3 group (Fig 4O), no others changes in the cytokines GCF levels of non-destroyed or destroyed sites were found after treatment in either group. The percentage reduction of sites measurable to OC were 50-30%, INF- γ 10-0%, IL-6 40-100%, IL-4 10-0%, IL-1 β 20-30%, respectively in ω -3 and placebo group. TNF- α measurable sites raised 10%, in ω -3 group, and reduced 30% in placebo group. Taken together, cytokines changes of non-destroyed and destroyed sites were not further improved by either ω -3 supplementation or placebo in addition to non-surgical periodontal treatment.

Discussion

Gingival inflammation is a risk factor of periodontal disease. Nevertheless, gingivitis may remain stable for months or years and diagnostic measures to pinpoint the checkpoint of disease onset are lacking. In the present study we found that osteoclastogenesis related

cytokines in GCF were altered with the alveolar optical density which could improve evaluation of periodontal tissue damage and diagnosis of disease onset.

We assessed cytokines in GCF of clinically comparable sites without bone destruction of gingivitis and periodontitis patients as such factors may reflect intrinsic differences related to host response and disease susceptibility. We found higher IFN- γ , IL-10, RANK-L and OC in the sites of periodontitis patients compared to gingivitis and strikingly, IL-4 could only be detected in periodontitis and not in gingivitis patients. These changes are interesting as the clinical measurements and the percentage of demineralization was similar between groups. IL-4, IFN- γ and IL-10 are inhibitory molecules of RANK-L mediated osteoclast formation involved in bone homeostasis. Increased RANK-L in GCF of periodontitis patients has previously been shown and IFN- γ is suggested to increase the risk of disease progression. Elevation of IFN- γ , IL-10 and IL-4 in sites without tissue destruction of periodontitis patients compared to healthy was further suggested by Shaddox et al however, in their study they did not reach statistical significance. Papathanasiou et al. (2014) detected IL-4 only in 5.9% of sites from gingivitis patients whereas IL-4 was detected in 9.1% of sites from periodontitis patients, Moreover, high IL-4 has been associated with remission in periodontitis patients. This is interesting as we also detected an increase in IL-4 following periodontal treatment. IL-10 has been associated with periodontal disease severity with high expression of IL-10 in gingival tissue supernatants from periodontitis patients however available data on IL-10 expression in GCF of periodontitis patients is conflicting. Toker et al detected a lower percentage of sites with IL-10 in periodontitis compared to healthy patients whereas Gamamol et al were unable to detect IL-10 in the healthy subjects. These differences may reflect differences in the site definition but may also reflect the diversity of sample methodology employed to collect GCF. In our study we observed a significant decrease of IFN- γ , IL-6, IL-8 and OC in non-destroyed sites, but not IL-10, whereas IL-4 tended to increase following non-surgical periodontal treatment which is in agreement with previous studies that have evaluated cytokine changes in GCF following periodontal treatment. However, our data document for the first time the decrease of OC level after non-surgical periodontal therapy, treatment of periodontitis patients with subantimicrobial doxycycline and in postmenopausal women failed to reduce gingival crevicular fluid levels.

Periodontitis diagnosis and evaluation of disease progression is based on the loss of periodontal tissue and classification criteria of bone erosion is lacking and it is of value to

identify markers that reflect bone erosion. Early diagnosis and treatment are crucial in order to prevent irreversible tissue destruction and preserve the function defining the “window of opportunity” concept. Biomarkers of each component of the periodontal tissue could be useful to manage periodontitis patients. Local biochemical markers may contribute to better characterize the periodontal site to manage them according to risk of bone resorption activity, progression and remission. Their utility in clinical high to predict relapse, treat-to-target strategy and “personalized medicine”. In RA, though clinical remission is obtained, in some patients a structural progression can occur. The concept “Outside-Inside” suggested a beginning of RA disease also in the subchondral bone marrow. In RA, bone erosion increase after the clinical onset of disease and may in some patients continue after inflammation has ceased. TNF inhibitors and other biologics reduce synovitis, biomarkers of inflammation, and bone destruction. However, dissociation between clinical and radiological effect of TNF inhibitors has been reported. These TNF inhibitors are able to block joint destruction, even if RA disease is still active. Alveolar optical height reflects irreversible late bone damage followed by clinical periodontal parameters of tissue destruction used to assess the sequel of periodontitis. We detected significantly higher alveolar optical height, IL-1 β and OPG in destroyed compared to non-destroyed sites of periodontitis patients. Regulation of IL-1 β with disease progression is widely reported and IL-1 β is regarded to be a key cytokine in periodontal tissue destruction. Reports on OPG expression are controversial showing reduced OPG in sites from periodontitis compared with gingivitis patients, no differences, or higher expression in peri-implantitis compared to healthy implant sites. Of note, none of these studies related the cytokine expression to the mineralization grade of the alveolar bone. In our study we observed a significant decrease in IL-6, IL-8 and OC in destroyed sites following non-surgical periodontal treatment supported by previous observations, although changes of OC level after non-surgical periodontal therapy has been failed. Our findings thus support the conception of IL-6 as a key cytokine in periodontal pathogenesis and IL-6, IL-8 and OC may reflect response to treatment following nonsurgical periodontal therapy. Whether these cytokines would predict future damage will need to be further evaluated through prospective studies.

We present here the first time evidence for a relation between osteoclastogenesis related cytokines in GCF and alterations of the alveolar optical density in periodontitis patients. This is intriguing as evaluation of the optical density may reflect periodontal damage. We detected significantly higher RANK-L/OPG, OPG and OC in non-destroyed demineralized compared

to mineralized sites. Moreover, destroyed demineralized sites expressed significantly higher RANK-L and IL-6, whereas IL-1 β and IL-10 were lower expressed compared to mineralized sites. The observed increase in RANK-L and IL-6 in demineralized destroyed sites is consistent with the literature that show high level of them in periodontal disease progressive sites. Despite the potential involvement of other factors in the bone destruction process, prominent expression of RANKL by B and T cells in the periodontal disease lesion seems to play a primary role in the augmentation of bone resorption processes in this disease. It is suggested that RANKL inhibition may represent an important therapeutic strategy for the prevention of progressive alveolar bone loss. In RA, articular changes caused by chronic overexpression of TNF are not completely blockable by monotherapies that target TNF, IL-1, or RANKL. However, combined approaches, especially the combined blockade of TNF and IL-1 and, to a lesser extent, TNF and RANKL, lead to almost complete remission of disease. Differences in abilities to block synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction further strengthen the rationale for using combined blockade of more than one proinflammatory pathway. Warren et al. have taken a new approach to blocking the action of the TNF superfamily member RANKL. To generate an effective RANK inhibitor, were used an unbiased forward genetic approach to identify mutations in RANKL that had a 500-fold increased affinity for RANK but had decreased affinity for the decoy receptor OPG. Incorporating mutations that blocked receptor binding into this high-affinity RANKL variant generated a mutant RANKL that completely inhibited wild-type RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro and bone resorption in mice. This approach may be generalized to enable the inhibition of other TNF receptor signaling systems, which are implicated in a wide range of pathological conditions. In RA, whereas RANK-L and IL-6 driven directly the osteoclast activity, the synovial fibroblasts cytokines production leads to inhibition of osteoblast differentiation and consequently of bone formation through anti-anabolic molecule, sclerostin, by osteocytes. This finding suggests the use of optical density as a surrogate to diagnose periodontal damage. This could improve the classification and lead to more individualized therapeutic interventions and potentially lead to identification of risk sites before occurrence of irreversible tissue damage. Future studies will be directed towards the predictive value of alveolar optical density for periodontal tissue damage.

The potential therapeutic benefits of dietary supplementation with ω -3 LC-PUFAs have aroused great interest. SRP + ω -3 therapy increased significantly IL-4 expression in gingival crevicular fluid of non-destroyed and destroyed sites in periodontitis patients, whereas IFN- γ

and IL-10 decreased significantly from destroyed sites, in our study. In this context, ResolvinE1-derived ω -3 significantly enhanced expression of OPG without inducing change in RANKL levels indicating that ResolvinE1 modulates osteoclast differentiation and bone remodeling by direct actions on bone, rescuing OPG production and restoring a favorable RANKL/OPG ratio, in vitro bone cultures. In addition, ResolvinE1 was shown to inhibit periodontal bone loss induced by experimental periodontitis. Our study encourage investigations in human in this alveolar bone field, and then observe selected demineralized group of sites could have consistent evidences. However, the clinical analysis of periodontal status failed to demonstrate any difference between SRP+ ω -3 and SRP+placebo groups. Rosenstein et al. studied the clinical effect of dietary supplementation with ω -3 or ω -6 LC-PUFAs, or a combination of both, without any periodontal treatment. That study showed a significant decrease of gingival index and pocket depth after supplementation with ω -6, whereas ω -3 had no significant effect. Campan et al. gave ω -3 LC-PUFAs to subjects having an experimental gingivitis in order to enhance resolution of inflammation. The study failed to show a difference between the ω -3 LC-PUFAs and the placebo capsules. It is possible that the outcome of periodontal treatment is mainly dependent on local conditions. An additional anti-inflammatory effect of the ω -3 PUFA might be so small that it was not clinically measurable, maybe for clinical observations a greater sample size could give more consistent evidences. Although it is quite difficult to follow a greater number of patients for a long period, the present pilot study might encourage more investigations in this field. Recent study with 30 patients in each group, Deore et al, suggested that ω -3 can successfully improve the periodontal outcome. El-Sharkawy et al. and Naqvi et al evaluated the effect of ω -3 LC-PUFA supplementation associated with low doses of aspirin as an adjunct to scaling and found significant reductions in pocket depth and clinical attachment gain after treatment compared to placebo. Similarly, Elkouli showed better healing of furcation defects after supplementation with ω -3 LC-PUFAs and low dose aspirin. It is difficult to interpret the studies since the ω -3 LC-PUFAs are combined with aspirin. When aspirin is taken together with ω -3 LC-PUFAs, the ω -3 is metabolized into resolving molecules, aspirin-triggered lipoxin and resolving compounds that are longer-lasting and more potent than endogenous resolvins and lipoxins.

In summary we show altered cytokine expression in GCF in sites without tissue destruction of periodontitis patients with higher IFN- γ , IL-4, IL-10, RANKL and OC compared to clinically comparable sites of gingivitis patients thus, suggesting intrinsic differences. Moreover IL-1 β ,

OPG and the alveolar optical density is altered with tissue damage in periodontitis patients. The expression of RANK-L/OPG, OPG, OC, and IL-6 is increased in demineralized sites whereas IL-1 β and IL-10 are decreased suggesting alveolar optical density as a surrogate to assess periodontal damage. Non-surgical periodontal treatment result in increased IL-4 and decreased IFN- γ , IL-6, IL-8 and OC and supplementation with ω -3 does not affect the clinical outcome or the cytokine expression. Our findings may lead to improved classification and evaluation of periodontal damage which may lead to more individualized therapies.

References

1. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2001;25:8–20.
2. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000. 1997;14:9-11.
3. Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1984;11:21-32.
4. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2001;25:8–20.
5. Barros FC, Braga FF, Fischer RG, Figueredo CM. Effects of nonsurgical periodontal treatment on the alveolar bone density. *Braz Dent J*. 2014;25(2):90-5.
6. Szewczyk J, Koszowski R, Juźwiak R, Smieszek-Wilczewska J. A radiographic assessment of the regeneration process in post-operative alveolar bone defects in patients with different IL-1B-511 genotypes. *Adv Clin Exp Med*. 2013 Nov-Dec;22(6):847-54.
7. Reinhardt RA, Stoner JA, Golub LM, Lee HM, Nummikoski PV, Sorsa T, Payne JB. Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis. *J Periodontol*. 2010 Feb;81(2):251-9.
8. Rosa GM, Lucas GQ, Lucas ON. Cigarette smoking and alveolar bone in young adults: a study using digitized radiographs. *J Periodontol*. 2008 Feb;79(2):232-44.
9. Hwang YJ, Fien MJ, Lee SS, Kim TI, Seol YJ, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Chung CP, Han SB. Effect of scaling and root planing on alveolar bone as measured by subtraction radiography. *J Periodontol*. 2008 Sep;79(9):1663-9.

10. Hoff, M. et al. Cortical hand bone loss after 1 year in early rheumatoid arthritis predicts radiographic hand joint damage at 5-year and 10-year follow-up. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 324–329 (2009).
11. van der Heijde D, van der Helm-van Mil AH, Aletaha D, Bingham CO, Burmester GR, Dougados M, Emery P, Felson D, Knevel R, Kvien TK, Landewé RB, Lukas C, McInnes I, Silman AJ, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Zink A, Combe B. EULAR definition of erosive disease in light of the 2010 ACR/EULAR rheumatoid arthritis classification criteria. *Ann Rheum Dis.* 2013 Apr;72(4):479-81.
12. Haavardsholm, E. A., Bøyesen, P., Østergaard, M., Schildvold, A. & Kvien, T. K. Magnetic resonance imaging findings in 84 patients with early rheumatoid arthritis: bone marrow oedema predicts erosive progression. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 794–800 (2008).
13. McQueen, F. M. et al. Bone edema scored on magnetic resonance imaging scans of the dominant carpus at presentation predicts radiographic joint damage of the hands and feet six years later in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 1814–1827 (2003).
14. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2008;118:3537–45.
15. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2008 Aug;79(8 Suppl):1585-91.
16. Hecht C, Englbrecht M, Rech J, Schmidt S, Araujo E, Engelke K, Finzel S, Schett G. Additive effect of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor on bone erosions in patients with RA. *Ann Rheum Dis.* 2014 Aug 12. pii: annrheumdis-2014-205428.
17. de Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YP, Verpoort KN, Schreuder GM, Ewals JA, Terwiel JP, Roday HK, Kerstens PJ, Toes RE, de Vries RR, Breedveld FC, Dijkmans BA, Huizinga TW, Allaart CF. Progression of joint damage in early rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1, rheumatoid factor, and anti-citrullinated protein antibodies in relation to different treatment strategies. *Arthritis Rheum.* 2008 May;58(5):1293-8.
18. Alarcon RT, Fernandes Ada R, Laurindo IM, Bértolo MB, Pinheiro GC, Andrade LE. Characterization of cumulative joint damage patterns in patients with rheumatoid arthritis: a clinical, serological, and gene polymorphism perspective. *J Rheumatol.* 2015 Mar;42(3):405-12.

19. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:139-150.
20. Kremer JM, Lawrence DA, Petrillo GF, et al. (1995) Effects of high-dose fish oil on rheumatoid arthritis after stopping nonsteroidal anti-inflammatory drugs: clinical and immune correlates. *Arth Rheum* 38, 1107–1114.
21. Kolahi S, Ghorbanihaghjo A, Alizadeh S, et al. (2010) Fish oil supplementation decreases serum soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin ratio in female patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 43, 576–580.
22. Kremer JM, Lawrence DA, Jubiz W, et al. (1990) Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. *Arth Rheum* 33, 810–820.
23. Siriwardhana N, Kalupahana NS, Fletcher S, Xin W, Claycombe KJ, Quignard-Boulangé A, Zhao L, et al. n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids differentially regulate adipose angiotensinogen and other inflammatory adipokines in part via NF- κ B-dependent mechanisms. *J Nutr Biochem*. 2012 Dec;23(12):1661-7.
24. Nakanishi A, Iitsuka N, Tsukamoto I. Fish oil suppresses bone resorption by inhibiting osteoclastogenesis through decreased expression of M-CSF, PU.1, MITF and RANK in ovariectomized rats. *Mol Med Rep*. 2013 Jun;7(6):1896-903.
25. Kruger MC, Coetzer H, de Winter R, Gericke G, van Papendorp DH. Calcium, gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid supplementation in senile osteoporosis. *Aging (Milano)* 1998;10:385–394.
26. Watkins BA, Li Y, Lippman HE, Seifert MF. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and skeletal health. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001 Jun;226(6):485-97.
27. Kesavalu L, Vasudevan B, Raghu B, Browning E, Dawson D, Novak JM, et al. Omega-3 fatty acid effect on alveolar bone loss in rats. *J Dent Res* 2006;85:648–652.
28. Elkhoul AM. The efficacy of host response modulation therapy (omega-3 plus lowdose aspirin) as an adjunctive treatment of chronic periodontitis (Clinical and biochemical study): a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Periodont Res* 2011; 46: 261–268.
29. Figueredo CMS, Gustafsson A: Protease activity in gingival crevicular fluid. Presence of free protease *J Clin Periodontol* 1998; 25: 306-3.
30. Pradeep AR, Roopa Y, Swati PP. Interleukin-4, a T-helper 2 cell cytokine, is associated with the remission of periodontal disease. *J Periodont Res* 2008; 43:712–716.

31. Papathanasiou E, Teles F, Griffin T, Arguello E, Finkelman M, Hanley J, Theoharides TC. Gingival crevicular fluid levels of interferon- γ , but not interleukin-4 or -6 or thymic stromal lymphopoietin, are increased in inflamed sites in patients with periodontal disease. *J Periodont Res* 2014; 49: 55–61.
32. Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 145–153.
33. Toker H, Poyraz O, Eren K. Effect of periodontal treatment on IL-1 β , IL-1 α , and IL10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 507–513.
34. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 β , -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol*. 2000 Oct;71(10):1535-45.
35. Shaddox LM, Wiedey J, Calderon NL, Magnusson I, Bimstein E, Bidwell JA, Zapert EF, Aukhil I, Wallet SM. Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis. *J Dent Res*. 2011 Sep;90(9):1140-4.
36. Fujita Y, Ito H, Sekino S, Numabe Y. Correlations between pentraxin 3 or cytokine levels in gingival crevicular fluid and clinical parameters of chronic periodontitis. *Odontology*. 2012;100:215-21.
37. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 β and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent*. 2004; 32:511-520.
38. Tymkiw KD, Thunell DH, Johnson GK, et al. Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2011;38:219-228.
39. Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N, Aguillon JC, Puente J, Pozo P, Gamonal J. Levels of interferon- γ and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2009 Feb;80(2):290-6.
40. Tsai CC, Ku CH, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon- γ in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *Kaohsiung J Med Sci*. 2007 Jan;23(1):1-7.

41. Brown, A. K. et al. An explanation for the apparent dissociation between clinical remission and continued structural deterioration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 58, 2958–2967 (2008).
42. Chaudhari AU, Byakod GN, Waghmare PF, Karhadkar VM. Correlation of levels of interleukin-1 β in gingival crevicular fluid to the clinical parameters of chronicperiodontitis. *J Contemp Dent Pract.* 2011 Jan 1;12(1):52-9.
43. P. Emery, F. C. Breedveld, M. Dougados, J. R. Kalden, M. H. Schiff, and J. S. Smolen, “Early referral recommendation for newly diagnosed rheumatoid arthritis: evidence based development of a clinical guide,” *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 61, no. 4, pp. 290–297, 2002.
44. J. R. O’Dell, “Treating rheumatoid arthritis early: a window of opportunity?” *Arthritis and Rheumatism*, vol. 46,no. 2, pp. 283–285, 2002.
45. S. Lillegraven, F. H. M. Prince, N. A. Shadick et al., “Remission and radiographic outcome in rheumatoid arthritis: application of the 2011 ACR/EULAR remission criteria in an observational cohort,” *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 71, no. 5, pp. 681–686, 2012.
46. G. Schett and G. S. Firestein, “Mr Outside and Mr Inside: classic and alternative views on the pathogenesis of rheumatoid arthritis,” *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 69, no. 5, pp. 787–789, 2010.
47. P. E. Lipsky, D. M. van der Heijde, E. W. St Clair et al., “Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 343, no. 22, pp. 1594–1602, 2000.
48. M. C. Genovese, J. M. Bathon, R. W. Martin et al., “Etanercept versus methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: two-year radiographic and clinical outcomes,” *Arthritis and Rheumatism*, vol. 46, no. 6, pp. 1443–1450, 2002.
49. E. C. Keystone, A. F. Kavanaugh, J. T. Sharp et al., “Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebocontrolled, 52-week trial,” *Arthritis and Rheumatism*, vol. 50,no. 5, pp. 1400–1411, 2004.
50. Golub LM, Lee HM, Greenwald RA, Ryan ME, Sorsa T, Salo T, Giannobile WV. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation

- fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflamm Res* 1997;46: 310–319.
51. Bullon P, Chandler L, Segura Egea JJ, Perez Cano R, Martinez Sahuquillo A. Osteocalcin in serum, saliva and gingival crevicular fluid: their relation with periodontal treatment outcome in postmenopausal women. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007 May 1;12(3):E193-7.
 52. Fardellone P, Séjourné A, Paccou J, Goëb V. Bone remodelling markers in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:484280.
 53. Takayanagi, H., Ogasawara, K., Hida, S., Chiba, T., Murata, S., Sato, K., Takaoka, A., Yokochi, T., Oda, H., Tanaka, K., Nakamura, K., and Taniguchi, T. (2000) T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN γ . *Nature* 408, 600605
 54. Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*. 2004;83:166-169.
 55. Vernal, R, Chaparro, A, Graumann, R, Puente, J, Valenzuela, MA & Gamonal, J. Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol*. 2004;75:1586–1591.
 56. Lu, HK, Chen, YL, Chang, HC, Li, CL & Kuo, MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontol Res*. 2006;41:354–360.
 57. Bostanci, N, Ilgenli, T, Emingil, G, et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol*. 2007;34: 370–376.
 58. Reis C, DA Costa AV, Guimarães JT, Tuna D, Braga AC, Pacheco JJ, Arosa FA, Salazar F, Cardoso EM. Clinical improvement following therapy for periodontitis: Association with a decrease in IL-1 and IL-6. *Exp Ther Med*. 2014 Jul;8(1):323-327.
 59. Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, Aravena O, Lastres P, Pozo P, Vernal R, Gamonal J. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol*. 2008 Mar;35(3):206-14.

60. Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1995 Nov;22(11):885-90.
61. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, Goncalves RB, Valverde P, Dibart S, Li YP, Miranda LA, Ernst CW, Izumi Y, Taubman MA. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*. 2006 Sep;169(3):987-98.
62. Zwerina J, Hayer S, Tohidast-Akrad M, Bergmeister H, Redlich K, Feige U, Dunstan C, Kollias G, Steiner G, Smolen J, Schett G. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction. *Arthritis Rheum*. 2004 Jan;50(1):277-90.
63. Warren JT, Nelson CA, Decker CE, Zou W, Fremont DH, Teitelbaum SL. Manipulation of receptor oligomerization as a strategy to inhibit signaling by TNF superfamily members. *Sci Signal*. 2014 Aug 19;7(339):ra80.
64. Sakellari, D, Menti, S & Konstantinidis, A. Free soluble receptor activator of nuclear factor-kappa ligand in gingival crevicular fluid correlates with distinct pathogens in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2008;35:938–943.
65. Sarlati F, Sattari M, Razzaghi S, Nasiri M. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin levels in gingival crevicular fluid. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012;9:752-7.
66. Rakic M, Lekovic V, Nikolic-Jakoba N, Vojvodic D, Petkovic-Curcin A, Sanz M. Bone loss biomarkers associated with peri-implantitis. A cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Oct;24(10):1110-6.
67. Gao L, Faibish D, Fredman G, Herrera BS, Chiang N, Serhan CN, Van Dyke TE, Gyurko R. Resolvin E1 and chemokine-like receptor 1 mediate bone preservation. *J Immunol*. 2013 Jan 15;190(2):689-94.
68. Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, Arita M, Ebrahimi N, Chiang N, Petasis NA, Levy BD, Serhan CN, Van Dyke TE. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *Faseb J*. 2006; 20:401–403.
69. Campan P, Planchand P, Duran D. Pilot study on n-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of human experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* 1997; 24:907-913.
70. Deore GD, Gurav AN, Patil R, Shete AR, Naiktari RS, Inamdar SP. Omega 3 fatty acids as a host modulator in chronic periodontitis patients: a randomised, double-

- blind, placebo-controlled, clinical trial. *J Periodontal Implant Sci.* 2014 Feb;44(1):25-32.
71. Naqvi AZ, Hasturk H, Mu L, Phillips RS, Davis RB, Halem S, Campos H, Goodson JM, Van Dyke TE, Mukamal KJ. Docosahexaenoic Acid and Periodontitis in Adults: A Randomized Controlled Trial. *J Dent Res.* 2014 Jun 26;93(8):767-773.
72. Arita M, Clish CB, Serhan CN. The contributions of aspirin and microbial oxygenase to the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: novel oxygenase products from omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:149-157.

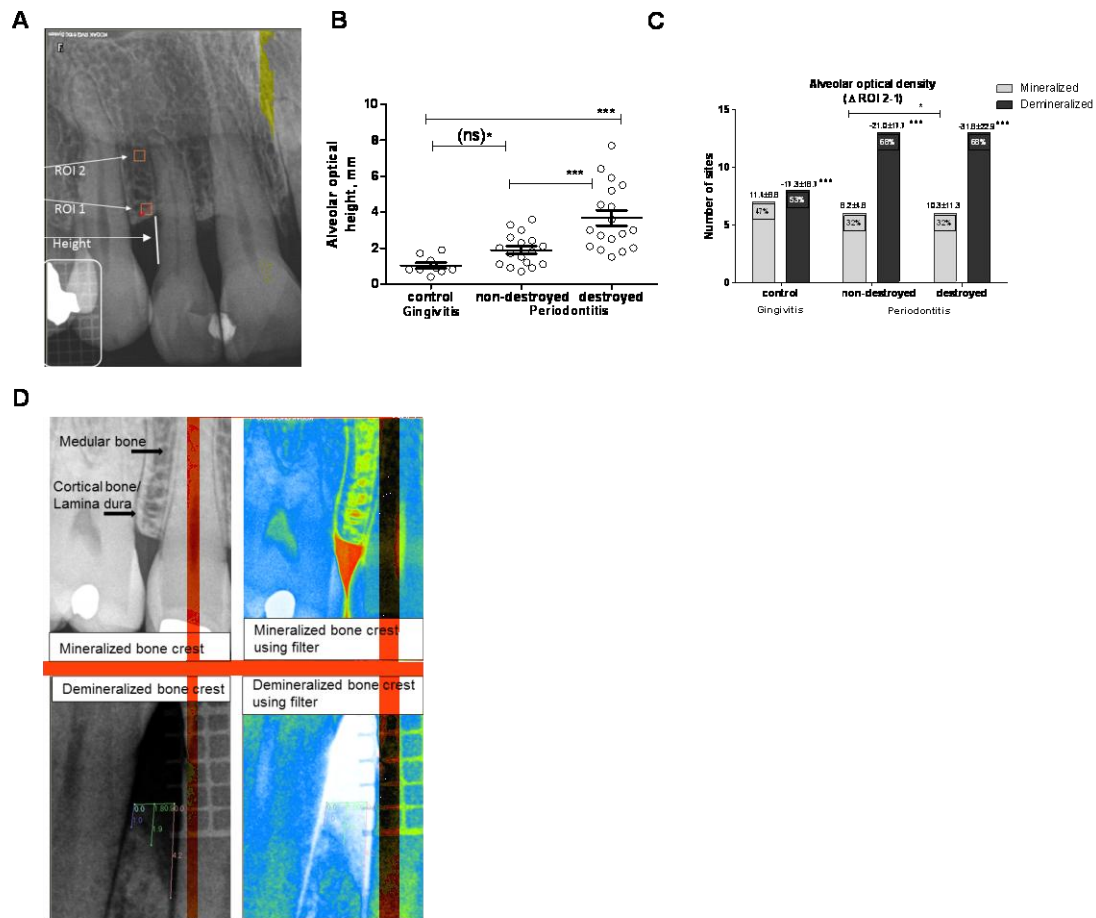


Figure 1. Periodontal optical data of study participants.

The periodontal optical parameters by (A) periapical X-ray showing the alveolar optical height and the region of interest (ROI) 1 and 2. (B) The bone crest optical height in control sites from gingivitis and non-destroyed and destroyed sites from periodontitis patients and (C) the number and percentage of sites with mineralization or demineralization assessed by the Δ ROI 2-1 alveolar optical density and mean values of alveolar optical density (above bars). (D) Representative illustration of sites with presumed bone crest mineralization and demineralization by conventional periapical X-ray (black and white) and color filter. Comparison between gingivitis control and non-destroyed and destroyed sites of periodontitis patients (Mann-Whitney Test), procedure general linear model (GLM), with analysis of covariance (ANCOVA) adjusted for age and gender between parentheses, and between non-destroyed and destroyed sites of periodontitis patients (Wilcoxon W). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

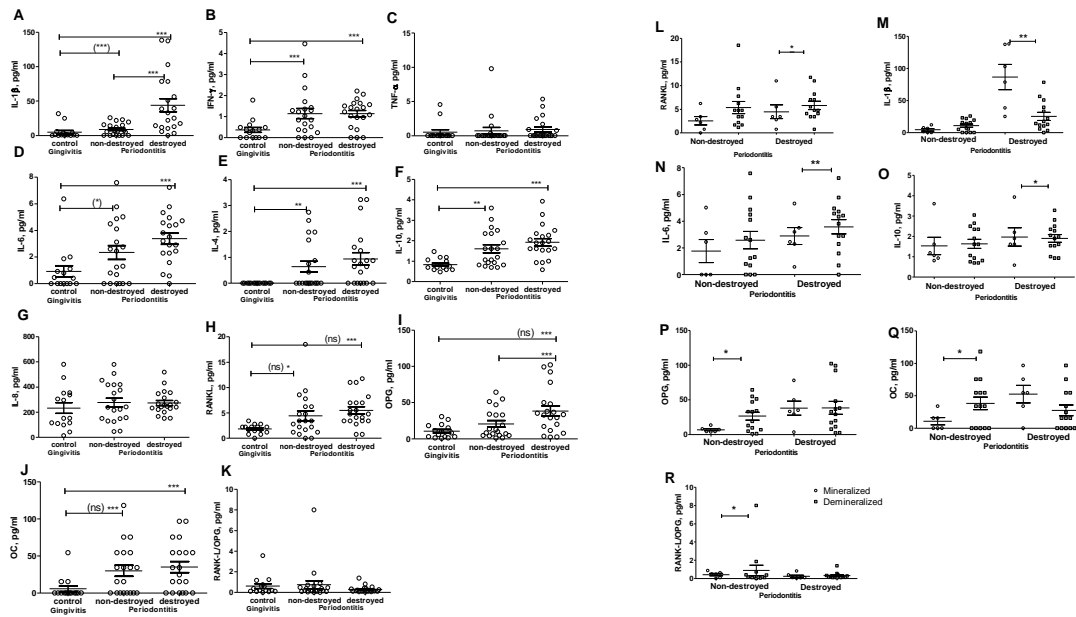


Figure 2. Cytokines levels in gingival crevicular fluid of gingivitis control sites and non-destroyed and destroyed sites sites of periodontitis patients.

(A) IL-1 β , (B) IFN- γ , (C) TNF- α , (D) IL-6, (E) IL-4, (F) IL-10, (G) IL-8, (H) RANK-L, (I) OPG, (J) OC and (K) RANK-L/OPG in GCF of control sites from gingivitis and non-destroyed and destroyed sites from periodontitis patients. (L) RANK-L, (M) IL-1 β , (N) IL-6, (O) IL-10, (P) OPG, (Q) OC and (R) RANK-L/OPG in periodontitis sites subgrouped into mineralized and demineralized sites. Comparison between gingivitis control and non-destroyed and destroyed sites of periodontitis patients (Mann-Whitney Test), procedure general linear model (GLM), with analysis of covariance (ANCOVA) adjusted for age and gender between parentheses, and between non-destroyed and destroyed sites, and between mineralized and demineralized sites of periodontitis patients (Wilcoxon W). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

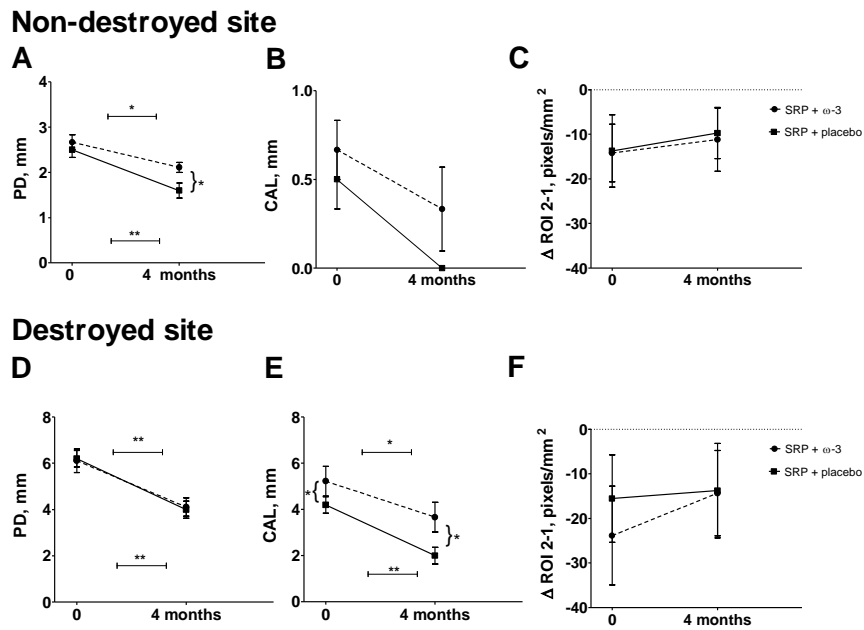


Figure 3. Periodontal clinical and optical data of intervention groups.

The periodontal parameters (A) probing depth (PD), (B) clinical attachment level (CAL), (C) the alveolar optical density in region of interest (ROI) Δ 2-1 in non-destroyed and (D, E, F) destroyed sites of periodontitis patients at baseline (0) and 4 months following SRP+ ω -3 versus SRP+placebo. Comparison between SRP+ ω -3 and SRP+placebo (Mann-Whitney Test) indicated vertically, comparison between baseline (0) and 4 months (Wilcoxon W) indicated horizontally above the line. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

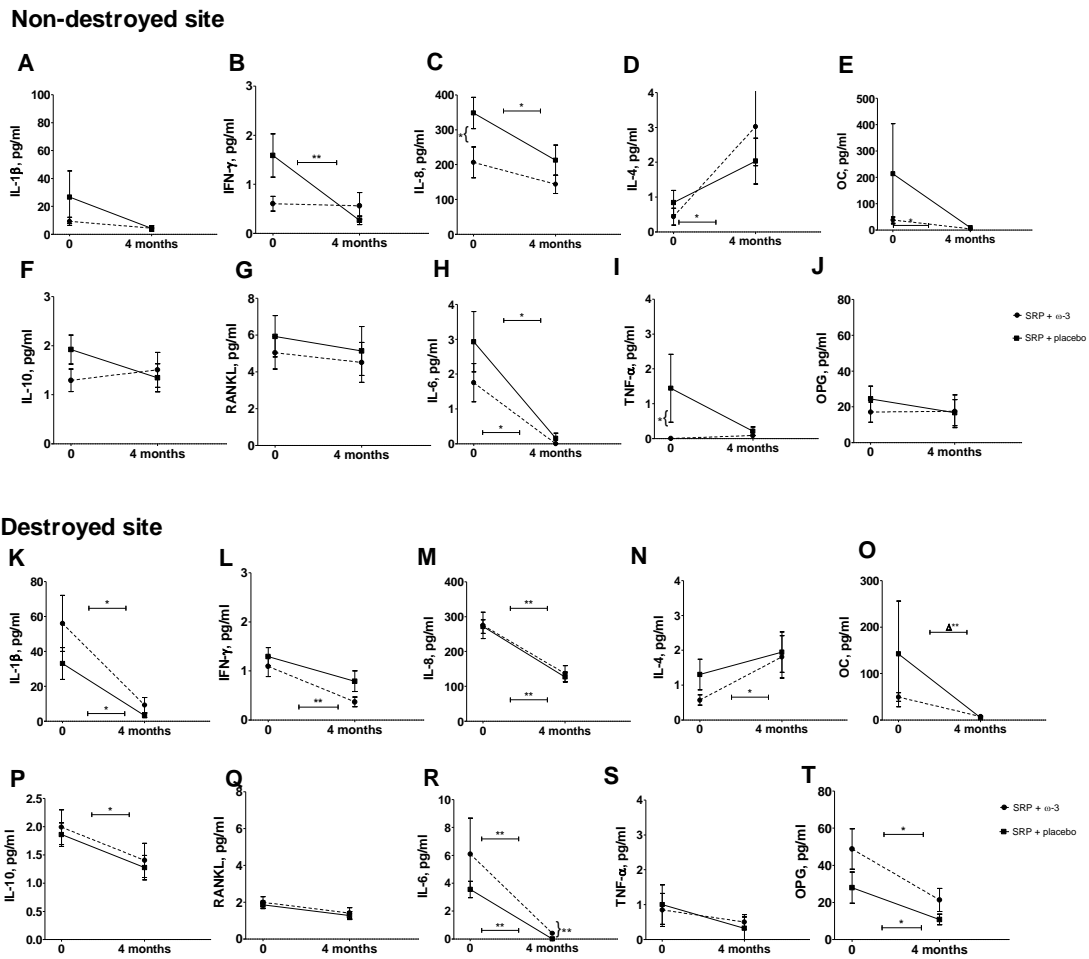


Figure 4. Cytokine levels in gingival crevicular fluid of non-destroyed and destroyed sites of intervention groups.

(A) IL-1 β , (B) IFN- γ , (C) IL-8, (D) IL-4, (E) OC, (F) IL-10, (G) RANK-L, (H) IL-6, (I) TNF- α and (J) OPG levels in GCF of non-destroyed and (K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T) destroyed sites at baseline (0) and 4 months following SRP+ ω -3 versus SRP+placebo. Comparison between SRP+ ω -3 and SRP+placebo (Mann-Whitney Test) shown by the {, comparison between baseline (0) and 4 months (Wilcoxon W) of groups shown above the line. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

Table 1. Clinical and demographic characteristics of gingivitis and periodontitis patients.

	Gingivitis	Periodontitis	P value
*Age, mean \pm SD	31.6 \pm 7.3	46.0 \pm 9.0	\leq 0.001
†Gender, % men/women	20/80	35/65	0.458
†Race, % non-white/white	73/27	45/55	0.167
¶Smoker/never smoker, %	0/100	30/70	0.066
*Number of teeth, mean \pm SD (range)	26.7 \pm 1.3 (4)	23.4 \pm 3.4 (12)	0.003
*Number of teeth with interproximal PD \geq 5 mm and CAL \geq 3 mm, mean \pm SD (range)	0	10.9 \pm 5.4 (17)	
*PD, mean \pm SD	1.3 \pm 0.5	3.2 \pm 0.5	\leq 0.001
*CAL, mean \pm SD	0.2 \pm 0.1	1.9 \pm 0.7	\leq 0.001
*BOP %, mean \pm SD	15.1 \pm 12.0	18.8 \pm 17.0	0.842
*PI %, mean \pm SD	28.4 \pm 18.8	60.2 \pm 24.8	\leq 0.001

PD, probing depth total (mm); CAL, clinical attachment level total (mm); BOP, bleeding on probing (%); PI, O'Leary's plaque index (%).

*Compared using general linear model (GLM) procedure with analysis of covariance (ANCOVA) adjusted to age and gender.

†Compared using Fisher exact test.

¶Compared using Pearson chi-square test

Supplement table 1. Clinical and demographic characteristics of periodontitis patients of the intervention groups.

		Periodontitis SRP+ ω -3	Periodontitis SRP+placebo
*Age, mean \pm SD		44.4 \pm 6.4	47.8 \pm 1.11
†Gender, % men/women		3/7	4/6
†Race, % non-white/white		5/5	4/6
¶Smoker/never smoker, %		2/8	4/6
*PD	0	3.4 \pm 0.5	3.1 \pm 0.5
	4mo	**2.4 \pm 0.3	**2.2 \pm 0.4
*CAL	0	2.0 \pm 0.8	1.8 \pm 0.6
	4mo	**1.4 \pm 0.9	**1.2 \pm 0.7
*BOP %	0	23.4 \pm 20.8	14.2 \pm 11.5
	4mo	*8.4 \pm 9.1	6.6 \pm 4.9
*PI %	0	61.6 \pm 27.3	58.8 \pm 23.5
	4mo	49.8 \pm 15.2	47.4 \pm 26.2

PD, probing depth total (mm); CAL, clinical attachment level total (mm); BOP, bleeding on probing (%); PI, O'Leary's plaque index (%).

No differences were found between SRP+ ω -3 and SRP+placebo groups using Mann-Whitney Test [*], Fisher exact test [†] and Pearson chi-square test [¶].

Comparison before (0) and after (4mo) therapy using Wilcoxon Signed Ranks Test [*p \leq 0.05; **p \leq 0.01; ***P \leq 0.001].

ANEXO A – Comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Rio de Janeiro, 15 de Dezembro de 2010

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Wille Oigman
Para: Aut. Gisele Lago Martinez
Orient. Prof. Carlos Marcelo da S. Figueredo

Registro CEP/HUPE: 2714/2010 (este número deverá ser citado nas correspondências referentes ao projeto)
CAAE: 0159.0.228.000-10

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto, "EFEITO ADJUNTO DE UMA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR A BASE DE OMEGA-3 NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE CRÔNICA" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o termo de consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HUPE/UERJ

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisa: Efeito adjunto de uma suplementação alimentar a base de omega-3 no tratamento da periodontite crônica

Prezado Sr(Sra).

O objetivo da pesquisa a qual você está sendo convidado a participar, voluntariamente, é avaliar o efeito adjunto da utilização de uma suplementação alimentar à base de Ômega-3 no tratamento da periodontite crônica através de uma análise clínica, imunológica e microbiológica; antes e após tratamento periodontal não cirúrgico em intervalos de 0, 4, 8 e 12 meses. Para participar deste estudo é necessário não ter tido qualquer tipo de infecção e/ ou ter feito uso de qualquer tipo de antibiótico nos últimos 6 meses e antiinflamatório nos últimos 3 meses. O protocolo da pesquisa envolve o exame clínico periodontal (da gengiva), exame radiográfico, análise microbiológica (análise de bactérias), análise do fluido gengival (citocinas inflamatórias) e exame de sangue (proteína C-reativa, lipidograma e ácidos graxos poliinsaturados) que serão efetuados por profissionais qualificados sem qualquer custo para o paciente, na Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

O benefício aos participantes da pesquisa é individual, sendo os riscos e desconfortos mínimos. Todos os pacientes serão orientados quanto às doenças bucais e os pacientes com doença periodontal serão tratados com procedimentos habituais que incluem: raspagem supragengival, profilaxia, instrução de higiene oral, raspagem subgengival quando acometidos por periodontite e suplementação alimentar à base de Omega 3 ou gelatina. Os dados da pesquisa podem vir a ser publicados e divulgados em revista científica para benefício coletivo.

Você tem a liberdade de solicitar esclarecimentos sempre que desejar e, caso durante a pesquisa, algum problema o (a) impeça de continuar participando do projeto, você terá liberdade em desistir e não sofrerá qualquer tipo de penalização por isso. A pesquisa terá a duração mínima de 1 (um) ano a contar da data de assinatura deste termo. Em caso de dúvida de âmbito da pesquisa, de seus direitos ou a respeito do tratamento instituído, por favor, contate o responsável Gisele Martinez, telefone: (21) 83301379.

Declaro ter lido e sido convenientemente esclarecido (a) dos termos da presente pesquisa e, portanto, consinto voluntariamente em participar, abaixo assinando e recebendo também uma cópia assinada pelo responsável da pesquisa.

Nome do Paciente: _____

Assinatura: _____

Rio de Janeiro, _____/_____/2011.

Assinatura do profissional responsável pela pesquisa

ANEXO C – Questionário de frequência alimentar

FORMULÁRIO DE ATENDIMENTO NUTRICIONAL**IDENTIFICAÇÃO**

Nome:	
Data de Nasc.:	
Nº paciente:	Data:

ESTILO DE VIDA/ ANAMNESE ALIMENTAR/ OUTROS

Atividade Física: _____

Etilista: _____ **Tabagismo:** _____

Ritmo intestinal: _____

Suplementos

nutricionais: _____

Adoçante/açúcar? _____ Ingestão Hidrica: _____

Litros de óleo por mês/ tipo: _____

AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Peso Teórico:

Peso Ideal ($\pm 10\%$ PT):

Altura:

Parâmetros	/ /	/ /	/ /	/ /
Peso (kg)				
IMC (kg/m ²)				
CC (cm)				

DIAGNÓSTICO NUTRICIONAL

RECORDATÓRIO 24H

REFEIÇÃO/ HORA	LOCAL	ALIMENTOS	MEDIDAS CASEIRAS

FREQUÊNCIA ALIMENTAR

ALIMENTO	TIPO	DIÁRIA	SEMANAL	MENSAL
<i>Leite</i>				
<i>Iogurte</i>				
<i>Queijo</i>				
<i>Requeijão</i>				
<i>Arroz</i>				
<i>Macarrão</i>				
<i>Batata</i>				
<i>Pão</i>				
<i>Cream-craker</i>				
<i>Feijão</i>				
<i>Ervilha</i>				
<i>Lentilha</i>				
<i>Grão de bico</i>				
<i>Carne bovina</i>				
<i>Carne de frango</i>				
<i>Carne suína</i>				
<i>Miúdos</i>				
<i>Embutidos</i>				
<i>Visceras</i>				
<i>Frutos do mar</i>				
<i>Pescados*</i>				
<i>Ovo</i>				
<i>Frutas/ Sucos</i>				
<i>Vegetais folhosos</i>				
<i>Legumes</i>				
<i>Creme de leite</i>				
<i>Doces</i>				
<i>Biscoito recheado</i>				
<i>Bebidas</i>				
<i>Outros</i>				

*Especificar os pescados:
