

## LES BIOMARQUEURS DU FLUIDE GINGIVAL ET LEURS INTÉRÊTS DIAGNOSTIQUE ET PRONOSTIQUE DANS LES PARODONTITES : REVUE SYSTÉMATIQUE D'ESSAIS CLINIQUES RANDOMISÉS

### THE BIOMARKERS OF GINGIVAL CREVICULAR FLUID AND THEIR DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC INTERESTS IN PERIODONTITIS: A SYSTEMATIC REVIEW OF RANDOMIZED CLINICAL TRIALS

GUIRASSY ML<sup>1</sup>, KANE AST<sup>2</sup>, LECOR PA<sup>3</sup>, ALVAREZ D<sup>4</sup>, THIAM D<sup>1</sup>, DIALLO A<sup>1</sup>, BENOIST H-M<sup>1</sup>

1-Service de Parodontologie département d'odontologie Université Cheikh Anta Diop Dakar

2-Service d'Odontologie, Hôpital Militaire de Bamako IHB (Mali).

3-Service de physiologie orofaciale Département d'odontologie, université Cheikh Anta Diop Dakar Sénégal

4-Service d'odontologie Hopital militaire de Ouakam (Dakar / Sénégal)



#### Correspondance : Dr Mouhamadou Lamine GUIRASSY

Maitre assistant, Service de Parodontologie, Département d'odontologie, université Cheikh Anta Diop Bp : 5005 Dakar- Fann, Sénégal. Email : [guirassyml@yahoo.fr](mailto:guirassyml@yahoo.fr) / Tel : 00221778869580

#### RESUME

**Introduction :** Les biomarqueurs sont des molécules quantifiables et caractéristiques d'une condition physiologique ou pathologique. De nombreuses études ont identifié des marqueurs de la réponse immunitaire dans le fluide gingival crevulaire (FGC) au cours de la parodontite. Mais, les résultats sont très hétérogènes, parfois contradictoires et biaisés. L'objectif de cette revue systématique est d'évaluer l'apport diagnostique des marqueurs du fluide gingival crevulaire dans la progression des parodontites.

**Matériel et méthodes :** Une recherche bibliographique électronique a été réalisée dans les bases de données comme Pubmed / Medline, Embase, Cochrane et Pascal et complétée par une recherche manuelle.

**Résultats :** Au total, 459 articles ont été présélectionnés mais après l'application des filtres et critères d'inclusion, 21 articles scientifiques ont été retenus pour une analyse finale.

La lecture critique a été faite par deux investigateurs en aveugle sur les auteurs et l'origine de la revue avec le support de la grille d'évaluation des tests de diagnostic Quadas.

**Conclusion :** cette étude a permis de confirmer la présence dans le FGC des cytokines, des enzymes de destruction tissulaire du parodonte mais aussi des immunoglobulines notamment les IgG2. L'analyse de ces marqueurs permet de discriminer les patients à risque évolutif.

**MOTS CLÉS :** BIOMARQUEURS, FLUIDE GINGIVAL CREVICULAIRE, DIAGNOSTIC DE LA PARODONTITE, RÉPONSE IMMUNITAIRE

#### ABSTRACT

**Introduction:** Biomarkers are quantifiable molecules that are characteristic of a physiological or pathological condition. Numerous studies have identified markers of the immune response in the gingival crevicular fluid (GCF) during periodontitis; but the results are very heterogeneous, sometimes contradictory and biased. The objective of this systematic review is to evaluate the diagnosis contribution of biomarkers of gingival fluid in the prediction of periodontitis.

**Methods:** An electronic bibliographic search was carried out in databases such as PubMed / Medline, Embase, Cochrane and Pascal and supplemented by a manual search

**Results:** A total of 459 articles were screened but after the application of the filters and inclusion criteria, 21 scientific papers were selected for final analysis.

Critical reading was done by two blind investigators on the authors and origin of the review with support of the evaluation grid of Quadas diagnostic tests.

**Conclusion:** This study confirmed the presence in the GCF of cytokines, tissue destruction enzymes of the periodontium but also immunoglobulins including IgG2. The analysis of these markers makes it possible to discriminate patients with evolutive risk.

**KEYWORDS:** BIOMARKERS, GINGIVAL CREVICULAR FLUID, DIAGNOSIS OF PERIODONTITIS, IMMUNE RESPONSE

## INTRODUCTION

Les maladies parodontales sont des pathologies infectieuses dues à des bactéries anaérobies gram négatif. Elles sont caractérisées par une inflammation des tissus de soutien de la dent pouvant associer une destruction osseuse et évoluer vers une perte de l'organe dentaire [1].

La réponse immunitaire mise en œuvre au cours de la pathogénie de ces parodontopathies installe un processus inflammatoire chronique responsable des effets systémiques décrits dans la littérature et justifiant tout le lien entre maladies parodontales et maladies générales [2,3].

Le diagnostic conventionnel est basé principalement sur l'évolution et la mesure des paramètres cliniques, tels que la profondeur de poche parodontale, le niveau d'attache mais aussi les hauteurs d'os analysées au moyen de la radiographie; malheureusement ces critères ne permettent pas d'apprécier la physiopathologie de la maladie parodontale [4,5].

Aujourd'hui, le fluide gingival est considéré comme l'un des moyens les plus prometteurs pour indiquer l'activité de la maladie [6, 7]. Il s'agit d'un exsudat inflammatoire qu'on retrouve dans le sillon gingival ou dans la poche parodontale et qu'on peut prélever avec des pointes de papier filtre ou des tubes capillaires. Ce fluide traverse la barrière de l'épithélium jonctionnel et arrive dans le sulcus grâce à l'augmentation de la perméabilité capillaire [8].

Par la similitude de ses propriétés biochimiques au sérum sanguin, on retrouve dans le fluide gingival crevulaire (FGC) beaucoup de cellules et de molécules mises en jeu au cours de la réponse immunitaire [9]. La sévérité de l'inflammation des tissus parodontaux peut être estimée en mesurant les indicateurs pro-inflammatoires IL-1, -6, et -8 et TNF- $\alpha$  qui ont un rôle important dans la pathogénèse des maladies parodontales [10].

Dans la littérature, les marqueurs de l'inflammation et de la réponse immunitaire retrouvés dans le FGC au cours de la maladie parodontale ont fait l'objet de plusieurs études [11,12]. Mais, la complexité des mécanismes étiopathogéniques des maladies parodontales empêche jusqu'aujourd'hui la reconnaissance d'un biomarqueur ou même d'un ensemble de biomarqueurs (cluster) suffisamment sensibles et spécifiques pour le diagnostic, le pronostic et le suivi des maladies parodontales [13,14]. L'enjeu d'un outil diagnostique basé sur la réponse immunitaire

de l'hôte est qu'il remodèle la stratégie de prise en charge des maladies parodontales avec une revalorisation de l'approche préventive dans le but de réduire considérablement la prévalence et les conséquences des parodontites dont les effets systémiques constituent une véritable problématique de santé publique.

Ainsi, l'intérêt d'un test de diagnostic à partir de ces médiateurs est de plus en plus discuté, mais les résultats restent très hétérogènes, parfois contradictoires ou simplement biaisés.

L'objectif de ce travail est d'évaluer, par une revue systématique, l'apport diagnostique des marqueurs de l'inflammation et de la réponse immunitaire dans le fluide gingival crevulaire au cours de la progression des parodontites.

## MATERIEL ET METHODES

La question de recherche qui a justifié la mise en œuvre de ce travail est la suivante : les biomarqueurs du fluide gingival ont-ils un apport diagnostique suffisamment spécifique et sensible pour la prédiction de la progression des parodontites ?

### CRITÈRES D'INCLUSION

Il s'agit des études obéissant aux critères suivants :

- 1) les mots clés de l'article devront comporter: les marqueurs de l'inflammation et de la réponse immunitaire; fluide gingivo-dentaire; maladie parodontale;
- 2) la thématique de l'article doit être en rapport avec le dépistage ou le diagnostic;
- 3) article respectant les principes méthodologiques (calcul du nombre de sujets nécessaire et description de la population d'étude);
- 4) type d'étude: essai clinique contrôlé randomisé avec description du gold standard (test de référence) et de la description de la méthode statistique utilisée ;
- 5) articles publiés dans des revues avec comité de lecture en anglais ou en français.

### STRATÉGIE DE RECHERCHE

Une stratégie de recherche électronique a été mise au point et appliquée aux bases de données suivantes: PUBMED avec le thesaurus MeSH database, EMBASE, COCHRANE database, et PASCAL sans restriction de langue ni de période.

La méthode booléenne avec les mots clés suivants a été utilisée:

- terme A: Gingival crevicular fluid (GCF) OR;
- terme B: periodontal disease OR;
- terme C: immunologic markers OR;
- terme D: inflammation markers OR.

Ensuite des recombinaisons par croisement ont été faites pour ces quatre terminologies comme suit: (C or D) and (A and B).

Cette recherche bibliographique électronique a été complétée par une recherche manuelle dans des revues spécialisées en immunologie, en parodontologie mais aussi par l'apport de la littérature dans les bibliothèques et le contact de certains auteurs par mail.

#### ANALYSE DE LA QUALITÉ MÉTHODOLOGIQUE DES ÉTUDES

Les études pouvant être incluses dans cette revue étaient des études de type essai clinique randomisé. L'évaluation de la qualité méthodologique de toutes les études incluses a été réalisée de façon indépendante par deux lecteurs en aveugle sur l'auteur, et la revue de publication.

Les articles ainsi sélectionnés ont été exploités sous les items:

- 1) objectif de l'étude ;

#### RESULTATS

La recherche bibliographique totale sur la base des termes définis nous a permis d'obtenir 459 articles. A partir des critères d'inclusion formulés, 21 articles ont été retenus et analysés (Figure 1).

- 2) facteur de jugement;
- 3) gold standard utilisé ;
- 4) la méthodologie du protocole ;
- 5) le résultat et la conclusion.

#### PROCÉDURE DE SÉLECTION DES ÉTUDES

Les articles retrouvés ont été passés en revue en parcourant leur titre et résumé. Deux spécialistes en parodontologie (M.G et D.A) ont procédé de façon indépendante à une sélection des études à inclure dans cette revue systématique. Dans un premier temps, les titres et résumés des articles ont été passés en revue. Les articles qui n'étaient pas pertinents pour une inclusion ont été écartés dès ce stade.

Les copies intégrales des articles dont la lecture du titre et des résumés, n'était pas suffisamment informative pour leur inclusion finale dans la revue, ont été recherchées. Pour cela 2 procédés ont été utilisés : la consultation du programme HINARI et la consultation de la Bibliothèque Inter-universitaire de Médecine de Paris.

A la suite de ce travail de sélection réalisée de façon indépendante par les deux lecteurs concernés, une confrontation de leurs résultats a été effectuée. Des cas de divergences ont été solutionnés par des échanges et discussions ayant abouti à un consensus.

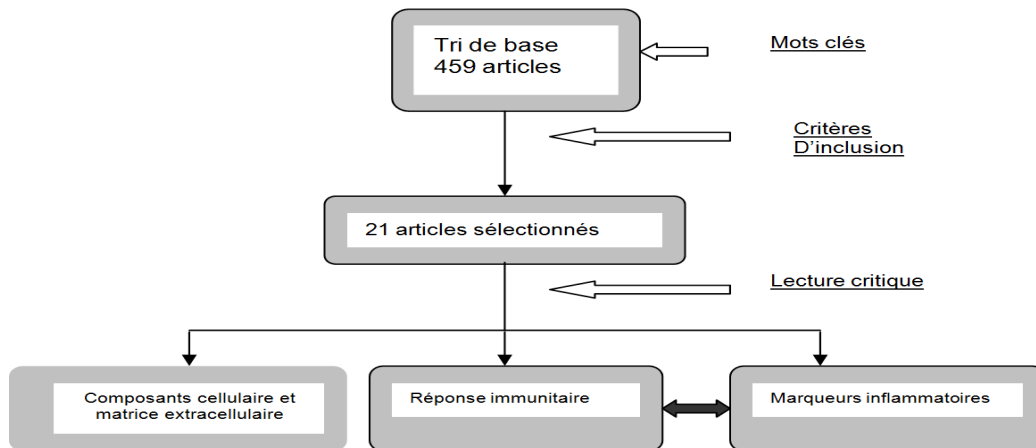


Figure 1 : Flow chart de la sélection des articles

**EXTRACTION ET SYNTHÈSE DES DONNÉES**

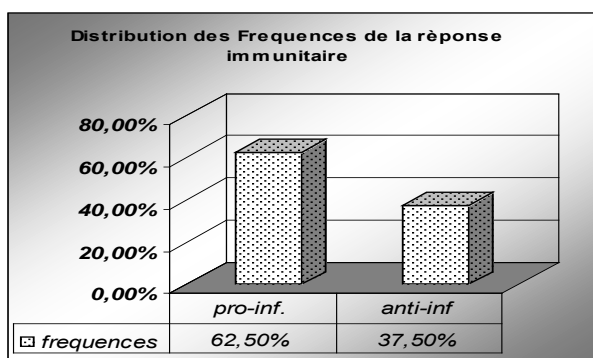
L'exploitation de l'ensemble de ces articles nous a permis de répertorier un total de seize (16) marqueurs qui ont constitué les différents facteurs de jugement au cours de ces études.

Dans certains cas, les auteurs ont utilisé plusieurs critères (marqueurs) dans une même étude.

L'ensemble des marqueurs mis en œuvre sont classés en pro-inflammatoires (n=10) et anti-inflammatoires (n=6) (Tableau I et Figure 2).

**Tableau I : Classification des marqueurs**

Type de réponse		Marqueurs	Indication (objectif)	Références
Marqueurs réaction inflammation- Réponse immunitaire	Pro-inflammatoire	Prostaglandine E 2 (PGE2)	Diag + suivi	15,16, 19, 21, 22, 23, 24, 25
		Interleukine 1-β (IL-1 β)	Diag + suivi	3, 6, 15, 17, 24, 25
		Interleukine 17 (IL-17)	Diag + suivi	20
		Interleukine 8 (IL-8)	Diag + suivi	6, 26
		RANKL (receptoractivator of	Diag + suivi	27
		Leukotriene B4	Diag + suivi	3, 22
	Anti-inflammatoire	Interféron gamma (INF gamma)	Suivi	24
		Immunoglobulines G,	Suivi	21
		Transforming growth factor (GCF-1)	Suivi	4
		Platelet activating factor (PAF)	Suivi	8
		Interleukine 4 (IL-4)	Suivi	15
Interleukine 10 (IL-10)	Suivi	24		
Marqueurs cellulaire et matrice extracellulaire	Pro-inflammatoire	Beta glucuronidase	Diag + suivi	28
		Phosphatase alcaline	Diag + suivi	37
		Metalloproteinases 1-8-13	Diag + suivi	29, 30
		Elastase	Diag + suivi	15



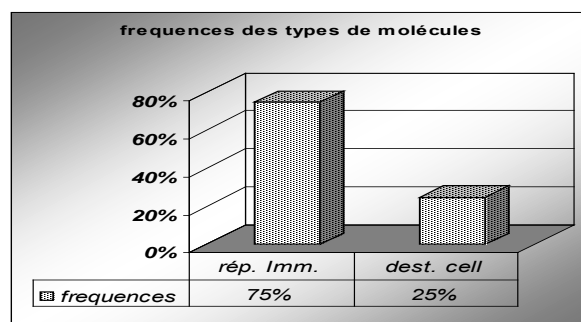
**Figure 2 : Distribution de la fréquence des marqueurs**

Ces molécules ont été classées en deux principaux groupes en fonction de leurs mécanismes de mise en œuvre.

L'un représenté par quatre (n=4) composants impliqués dans le processus de déstructuration cellulaire ou de la matrice extracellulaire du tissu parodontal au cours de la pathogénie de la parodontite, l'un composé de douze (n=12) marqueurs de la réaction inflammatoire et réponse immunitaire (Tableau II et Figure 3).

**Tableau II : Fréquence des marqueurs testés**

Pourcentages	Marqueurs pro-inflammatoires de la réponse immunitaire					
	PGE2	IL-1 β	IL-17	IL-8	RANKL	Leucotriène B4
	40%	30%	5%	10%	5%	10%



**Figure 3 : Distribution de la fréquence des types de molécules**

Par rapport à leur application en tant que facteur de jugement dans les études, la réponse immunitaire représente 84% des références, tandis que les résultats du métabolisme du tissu parodontal ont représenté 16% (Figure 4).



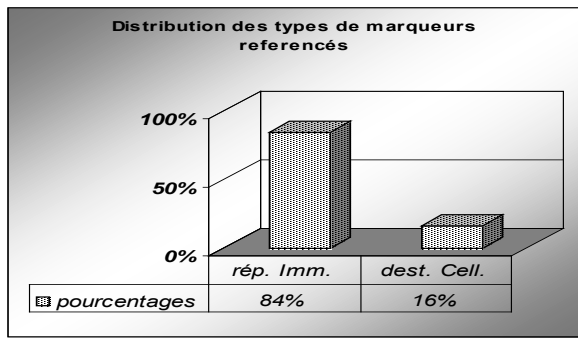


Figure 4 : Distribution des fréquences des marqueurs référencés

Les médiateurs immunitaires ont été majoritairement mis en évidence.

Les marqueurs de la réponse immunitaire sont composés essentiellement de cytokines (interleukines, des chimiokines, des facteurs de croissance, des interférons), des prostaglandines E2 et des immunoglobulines, tandis que ceux de la destruction de l'environnement parodontal sont constitués d'enzymes.

En intra-groupe des marqueurs de la réponse immunitaire nous avons noté un nombre égal de cytokines pro-inflammatoire et anti-inflammatoire. Cependant, 74% des articles ont mis en évidence les marqueurs pro-inflammatoires contre 26% pour les anti-inflammatoires.

Les prostaglandines et l'interleukine 1 $\beta$  dans le lot pro-inflammatoire symbolisent respectivement 40% et 30% (Figure 5).

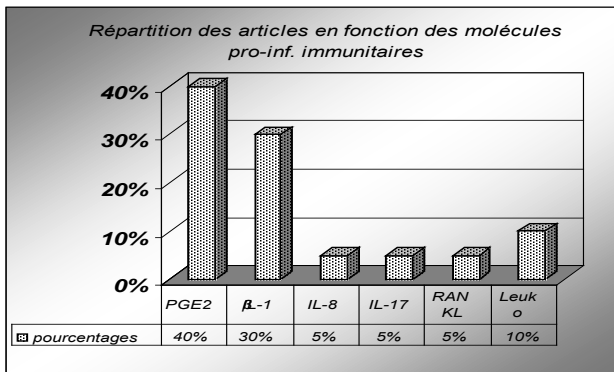


Figure 5 : Répartition des articles en fonction des types de marqueurs: PGE2 et IL- $\beta$  sont dominants

D'une part, toutes les études référencées ont eu soit un objectif de diagnostic soit de diagnostic et contrôle de l'évolution de la parodontite vers un rétablissement (régression des paramètres cliniques), ou une aggravation; d'où leur subdivision en test de diagnostic et diagnostic - suivi.

D'autre part, elles ont prouvé par un référentiel, «gold standard», la situation clinique de la maladie parodontale. Ce sont les paramètres cliniques (indices biologiques utilisés en épidémiologie de la maladie parodontale), les critères bactériologiques (culture et identification génomique : PCR en temps réel) et critères complémentaires radiologiques.

La distribution des fréquences des marqueurs (facteurs de jugement) en fonction des articles a permis de classer les molécules en pro-inflammatoires avec 81%, tandis que les anti-inflammatoires ont représenté 19%.

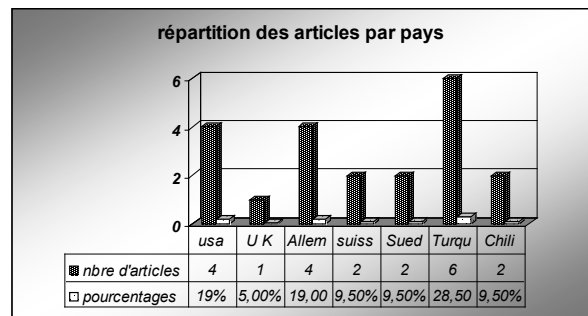


Figure 6 : Distribution des auteurs par pays

## DISCUSSION

Les résultats de cette revue systématique d'essais cliniques contrôlés randomisés ont permis de mettre en évidence la présence des marqueurs de la réponse immunitaire mais aussi des molécules tissulaires issues de l'inflammation locale dans le fluide gingival crevicaire(FGC) au cours de la maladie parodontale. Ce qui est la preuve d'un lien étroit entre cet exsudat et le milieu sanguin [6, 11,15].

Les différents marqueurs observés dans le FGC sont de la classe des cytokines et des enzymes. Les cytokines constituent des molécules de la médiation immunitaire mise en œuvre en réponse de la pathogénicité des bactéries parodontopathogènes. Ces marqueurs établissent un système de balance entre les pro-inflammatoires et les anti-inflammatoires. Les enzymes produites ont typiquement un profil pro-inflammatoire puisse qu'elles catalysent les mécanismes de dégradation cellulaire et de la matrice extracellulaire. Dans ces groupes, les métalloprotéines (MMPS) constituent la référence; mais aussi la beta ( $\beta$ ) glucuronidase ont montré une corrélation positive avec la gravité de la maladie.

Au cours de la phase aigüe de la parodontite, les résultats ont démontré une prévalence des cytokines pro inflammatoires caractérisées

notamment par l'interleukine -1  $\beta$ ; mais surtout les prostaglandines E2, confirmé dans les travaux de Kurtiset *al.* 2007<sup>[16]</sup>.

Les résultats ont aussi mis en évidence l'activité de certaines interleukines qui sont impliquées dans les mécanismes d'effets systémiques spécifiques de certains tissus de l'organisme. C'est le cas des cytokines RankL (molécules membranaires adhésives) et l'interleukine 17 dont le rôle dans la dégénérescence cartilagineuse est évoqué au cours de la polyarthrite rhumatoïde<sup>[17]</sup>. Les cytokines anti-inflammatoires ont été révélées dans les phases de suivi et de contrôle de la maladie. Ce sont les interleukines 10 et 4, les facteurs de croissance et les immunoglobulines G2 (IgG2) <sup>[18,19]</sup>.

La détection et la mesure de ces marqueurs ont été possibles par des techniques très accessibles et fiables telle que la méthode ELISA, mais aussi leur quantification qui permet d'évaluer leur variation dans le temps en fonction de l'évolution de la maladie.

Les articles traités dans cette étude n'ont mis en évidence qu'une partie d'un grand ensemble de cytokines. La recherche d'un bon niveau de preuve du diagnostic avec un schéma expérimental robuste a été notre priorité au détriment d'une collecte plus exhaustive de marqueurs. Cette étude n'a pas pris en compte les enquêtes longitudinales et transversales.

Les articles retenus font un échantillon d'une grande diversité d'auteurs (américain, européen asiatique etc. (Figure 6).

L'exigence d'un gold standard a contribué à éviter de traiter des cas cliniques biaisés. Cependant, la plus part d'entre eux ne sont représentés que par des critères cliniques (indices biologiques (profondeur de poche, indice gingival, etc..). Une seule étude a associé en sus l'examen bactériologique et radiologique. Le biais d'influence des revues et des auteurs a été évité par l'aveugle, mais aussi l'utilisation de la grille QUADAS <sup>[20]</sup> chez deux investigateurs.

Ces résultats viennent confirmer le point de vue sur le rôle que jouent les IL-1 $\beta$  dans la phase aigüe de la parodontite.

## CONCLUSION

L'analyse des biomarqueurs du fluide gingival crevulaire permet de discriminer les patients à risque évolutif. De telles investigations pourraient également se révéler fort utiles pour les

patients présentant des parodontites réfractaires. Théoriquement, nous pouvons attendre de tels marqueurs plusieurs types d'information telle que le diagnostic de la maladie, le diagnostic de susceptibilité à la maladie, l'identification des composants normaux présents à une concentration anormale, l'identification des composants anormaux.

Des traitements s'appuyant sur des critères de diagnostic plus évolués que la simple observation clinique et l'anamnèse de la maladie permettront probablement des thérapeutiques plus spécifiques et donc plus efficaces avec ultimement, une réduction des cas de parodontites réfractaires.

## REFERENCES

1. HURI CB, YAMALIK N, KILINC K, KILINC A, ETIKAN I, ERATALAY K. Analysis of the relationship between the severity of periodontal destruction and proteoglycan metabolism of gingiva and gingival crevicular flu. *J Clin Periodontol.* 2003; 30 (11): 961-8.
2. TELES .R, SAKELLARI .D, TELES .F et al., "Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota," *Journal of Periodontology.* 2010; 81(1): 89-98.
3. EBERHARD J, REIMERS N, DOMMISCH H, HACKER J, FREITAG S, ACIL Y, ALBERS HK, JEPSEN S. The effect of the topical administration of bioactive glass on inflammatory markers of human experimental gingivitis. *Biomaterials.* 2005; 26(13): 1545-51.
4. KURU L, GRIFFITHS GS, PETRIE A, OLSEN I. Changes in transforming growth factor-beta1 in gingival crevicular fluid following periodontal surgery. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(7): 527-33.
5. BUDUNELI D and KINANE F. "Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis," *Journal of Clinical Periodontology.* 2011; 38, (11): 85-105.
6. DEINZER R, WEIK U, KOLB-BACCHOFEN V, HERFORTH A. Comparison of experimental gingivitis with persistent gingivitis: differences in clinical parameters and cytokine concentrations. *Periodontal Res.* 2007; 42 (4): 318-24.
7. REINHARDT R.A, STONER J.A, GOLUB L.M et al., "Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis," *Journal of Periodontology.* 2010; 81, (2): 251-59.
8. KELES GC, CETINKAYA BO, ISILDAK I, KOPRULU H, ACIKGOZ G. Levels of platelet activating factor in gingival crevice fluid following periodontal surgical therapy. *J Periodontal Res.* 2006; 41(6): 513-8.

9. KOBAYASHI T, TAKAUCHI A, VAN SPIEL AB, VILE HA, HAYAKAWA M, S HIBATA Y, ABIKO Y, VAN DE WINKEL JG, YOSHIE H. Targeting of *Porphyromonasgingivalis* with a bispecific antibody directed to Fc $\alpha$ R1 (CD89) improves in vitro clearance by gingival crevicular neutrophils. *Vaccine*. 2004; 23(5): 585-94.
10. CHAUDHARI A.U, BYAKOD G.N, WAGHAMARE P.F, and KARHADKAR V. "Correlation of levels of interleukin-1 $\beta$  in gingival crevicular fluid to the clinical parameters of chronic periodontitis," *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2011; 12, (1): 52-59.
11. WHITE RP Jr, OFFENBACHER S, PHILIPS C, HAUG RH, BLAKEY GH, MARCIANI RD. Inflammatory mediators and periodontitis in patients with asymptomatic third molars. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002;60(11):1241-5.
12. SHARMA .A, PRADEEP A.R, RAGHAVENDRA N.M, ARJUN .P, and KATHARIYA .R, "Gingival crevicular fluid and serum cystatin c levels in periodontal health and disease," *Disease Markers*. 2012; 32 (2): 101-07.
13. NICOLAS D, MATHIAS B. Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-18, regulation and activity in local inflammation. *Periodontol 2000*. 2004; 35:42-52.
14. BELTRAN-AGUILAR ED, EKE PI, THORNTON- EVANS G, PETERSEN PE. Recording and surveillance systems for periodontal diseases. *Periodontol*. 2000. 2012; 39(3): 239-48.
15. GIANNOPOULOU C, ANDERSEN E, BROCHUT P, PLAGNAT D, MOMBELLI A. Enamel matrix derivative and systemic antibiotics as adjuncts to non-surgical periodontal treatment: biologic response. *J Periodontol*. 2006; 77 (4): 707-13.
16. KURTIS B, TUTER G, SERDAR M, PINAR S, DEMIREL I, TOYMAN U. Gingival crevicular fluid prostaglandin E (2) and thiobarbituric acid reactive substance levels in smokers and non-smokers with chronic periodontitis following phase I periodontal therapy and adjunctive use of flurbiprofen. *J Periodontol*. 2007; 78 (1): 104-11.
17. TRINDADE F, OPPENHEIM FG, HELMERHORST EJ, et al. Uncovering the molecular networks in periodontitis. *Proteomics Clin Appl*, 2014. DOI: 10.1002/prea. 201400028.
18. GOKUL K, "Estimation of the level of tumor necrosis factor in gingival crevicular fluid and serum in periodontal health and disease: A Biochemical Study," *Indian Journal of Dental Research*. 2012; 23(3): 348-52.
19. MIZRAK T, GUNCU GN, CAGLAYAN F, BALCI TA, AKTAR GS, IPEK F. Effect of a controlled-release chlorhexidine chip on clinical and microbiological parameters and prostaglandin E2 levels in gingival crevicular fluid. *J Periodontol*. 2006; 77(3): 437-43.
20. WHITING P, RUTJES A, REITSMA J, BOSSUYT P, KLEIJNEN J. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. *BMC Med Res Methodol* 2003; 3: 25.
21. ENGSTROM PE, SHI XQ, TRONJE G, LARSSON A, WELANDER U, FRITHIOF L, ENGSTROM GN. The effect of hyaluronan on bone and soft tissue and immune response in wound healing. *J Periodontol*. 2001 Sep; 72 (9): 1192-200.
22. PAQUETTE DW, LAWRENCE HP, MC COMBS GB, WILDER R, BINDER TA, TROULLOS E, ANNETT M, FRIEDMAN M, SMITH PC, OFFENBACHER S. Pharmacodynamic effects of ketoprofen on crevicular fluid prostanooids in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000 Aug; 27 (8): 558-66.
23. NEEDLEMAN IG, MOLES DR, COLLINS AM. Periodontal flap surgery with 25% metronidazole gel. (2). Effect on gingival crevicular fluid PGE2. *J Clin Periodontol*. 2000 Mar; 27(3): 193-7.
24. CUTLER CW, STANFORD TW, ABRAHAM C, CEDERBERG RA, BOARDMAN TJ, ROSS C. Clinical benefits of oral irrigation for periodontitis are related to reduction of pro-inflammatory cytokine levels and plaque. *J Clin Periodontol*. 2000 Feb; 27 (2): 134-43.
25. YUCEL-LINDBERG T, TWETMAN S, SKOLD-LARSSON K, MODEER T. Effect of an antibacterial dental varnish on the levels of prostanooids, leukotriene B4, and interleukin-1 beta in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand*. 1999; 57(1): 23-7.
26. PERINETTI G, SERRA E, PAOLANTONIO M, BRUE C, MEO SD, FILIPPI MR, FESTA F, SPOTO G. Lactate dehydrogenase activity in human gingival crevicular fluid during orthodontic treatment: a controlled, short-term longitudinal study. *J Periodontol*. 2005 Mar; 76 (3): 411-7.
27. BECK JD, OFFENBACHER S. Potential for gingival crevice fluid markers as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontology 2000* 2003; 31:167- 80.
28. SCHUBERT U, KLEBER BM, STRIETZEL FP, DORFLING P. Cross Laps and beta-glucuronidase in peri-implant and gingival crevicular fluid. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001; 16 (2): 252-8.
29. TUTER G, KURTIS B, SERDAR M, AYKAN T, OKYAY K, YUCEL A, TOYMAN U, PINAR S, CEMRI M, CENGEL A, WALKER SG, GOLUB LM. Effects of scaling and root planing and sub-antimicrobial dose doxycycline on oral and systemic biomarkers of disease in patients with both chronic periodontitis and coronary artery disease. *J Clin Periodontol*. 2007; 34 (8): 673-81.
30. ORINGER RJ, AI-SHAMMARI KF, ALDREDGE WA, IACONO VJ, EBER RM, WANG HL, BERWALD B, NEJAT R, GIANNOBILE WV. Effect of locally delivered minocycline microspheres on markers of bone resorption. *J Periodontol*. 2002; 73 (8): 835-42.