
Niveles de MMP-3 y MMP-8 en pacientes con periodontitis crónica antes y después del tratamiento periodontal no quirúrgico.

Adriana M. Romero, Patrizia Mastromatteo-Alberga, Laura Escalona, María Correnti.

Instituto de Investigaciones Odontológicas “Raúl Vincentelli”, Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: fluido gingival crevicular, MMP-3, MMP-8, periodontitis crónica.

Resumen. En la periodontitis crónica (PC) se desencadenan procesos inmunoinflamatorios, donde se liberan metaloproteinasas de la matriz (MMPs), enzimas involucradas en la degradación de la matriz extracelular, las cuales pueden ser detectadas en el fluido gingival crevicular (FGC). El propósito del estudio fue determinar los niveles de MMP-3 y MMP-8 en FGC, antes y después del tratamiento periodontal no quirúrgico (TPNQ) para evaluar actividad de la enfermedad y respuesta terapéutica. Once pacientes con periodontitis crónica y 11 controles sanos fueron seleccionados. Se evaluaron los parámetros clínicos: índice gingival, índice de placa, profundidad al sondaje y pérdida de inserción; en todos los dientes de cada individuo y en seis sitios por diente. Muestras de FGC fueron tomadas de un diente por cuadrante, con profundidad de saco ≥ 4 mm y pérdida de inserción ≥ 5 mm, los niveles de MMP-3 y MMP-8 fueron determinados por ELISA. Diferencias estadísticamente significativas fueron observadas entre los parámetros clínicos del grupo control y los pacientes con PC antes del tratamiento, registrándose posterior al TPNQ disminución significativa de todos los índices. Las concentraciones iniciales de MMP-3 y 8 en el grupo con PC fueron significativamente mayores a las obtenidas luego del TPNQ y en el grupo control, sin observar correlación entre parámetros clínicos y niveles de MMPs. La disminución significativa de los valores de MMP-3 y 8 en FGC de los pacientes con PC, posterior al TPNQ, indican la participación importante de estas enzimas en la degradación del tejido, y la efectividad del tratamiento periodontal para su control.

MMP-3 and MMP-8 levels in patients with chronic periodontitis before and after nonsurgical periodontal therapy.*Invest Clin 2013; 54(2): 138 - 148***Keywords:** gingival crevicular fluid, MMP-3, MMP-8, chronic periodontitis.

Abstract. Immune-inflammatory processes are triggered in chronic periodontitis (CP), where matrix metalloproteinases (MMPs) are released and involved in the degradation of the extracellular matrix components that can be detected in the gingival crevicular fluid (GCF). The purpose of the study was to determine the levels of MMP-3 and MMP-8 in GCF, before and after nonsurgical periodontal treatment (NSPT), to evaluate disease activity and therapy response. Eleven patients with PC and eleven healthy controls were selected. Clinical measurements to evaluate gingival index (GI), plaque index (PI), probing depth (PD) and clinical attachment loss (CAL) were made in all the teeth of each individual and in six sites per tooth. GCF samples were taken from one tooth per quadrant, with a pocket depth ≥ 4 mm and a clinical attachment loss ≥ 5 mm, and the levels of MMP-3 and MMP-8 measured using an ELISA test. Statistically significant differences in clinical parameters were observed ($p < 0.05$) between patients with CP and control groups before the periodontal treatment, with significant decrease in all indexes after the NSPT. The initial concentrations of MMP-3 and MMP-8 were significantly higher than those obtained after the NSPT and in the control group, without observing a correlation between the clinical parameters and the levels of MMPs. Increased levels of MMP-3 and MMP-8 in the GCF of patients with PC declined significantly after NSPT, and the difference between the levels in healthy individuals and patients, suggests the important participation of these MMPs in tissue destruction in PC disease..

Recibido: 26-10-2012. Aceptado: 04-04-2013

INTRODUCCIÓN

La periodontitis crónica es una enfermedad infecciosa caracterizada por la destrucción del tejido conectivo con pérdida progresiva de inserción periodontal y reabsorción del hueso alveolar. Los responsables de estos procesos son las bacterias de la biopelícula, sus productos y constituyentes como lipopolisacáridos (LPS) que actúan como antígenos, desencadenando procesos inflamatorios e inmunológicos a los que se suman las enzimas liberadas como consecuencia de la activación de distintos meca-

nismos tisulares, específicamente la activación de células residentes o células del infiltrado inflamatorio, dando como resultado la destrucción del tejido gingival y del hueso (1-6).

Entre las enzimas liberadas, las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), también llamadas matrixinas, son endopeptidasas que degradan las macromoléculas de la matriz extracelular (MEC); estas juegan un rol importante en muchos procesos biológicos tales como morfogénesis, ovulación, implantación del embrión y cicatrización de las heridas. Sin embargo se ha determinado

que en exceso, estas participan en la destrucción de los tejidos en muchas enfermedades del tejido conectivo como la artritis, nefritis, y la enfermedad periodontal (7). La importancia de estas enzimas en ambos, catabolismo fisiológico y patológico de la matriz, ha sido enfatizada debido a que poca actividad de MMPs es detectada en el tejido normal estable, pero su sobreexpresión por diversas células se ve estimulada ante la acción de citocinas inflamatorias, factores de crecimiento, enzimas, y productos bacterianos (7).

Numerosos estudios han planteado la relación entre las MMPs y la enfermedad periodontal debido a su responsabilidad en la degradación de los componentes de la matriz extracelular (8-12). La presencia de estas proteasas en el FGC es indicadora de la actividad de destrucción del tejido conectivo (13). El aumento de MMPs en los sitios enfermos en comparación con los sitios sanos y su disminución posterior al tratamiento periodontal en diferentes estudios, sugiere que las MMPs participan en la degradación del tejido periodontal (14). Dentro de la familia de estas proteasas, la metaloproteinasa 8 (MMP-8) o neutrófilo colagenasa y la metaloproteinasa 3 (MMP-3) o estromelina-1 han sido asociadas en múltiples oportunidades con la enfermedad periodontal. Los leucocitos polimorfonucleares (PMN), las células inmunes más abundantes presentes en el tejido gingival, son los principales productores de MMP-8, por su parte la MMP-3 es producida principalmente por los fibroblastos, que representan el componente celular predominante en el tejido conectivo gingival (8, 15). Además ambas metaloproteinasas tienen como sustrato de degradación el colágeno, elemento constitutivo principal del tejido conectivo periodontal (8, 15, 16). Es por ello que el propósito de este estudio es determinar y evaluar el comportamiento de los niveles de MMP-3 y MMP-8 en fluido gingival crevicular

de pacientes con periodontitis crónica antes y después de recibir tratamiento periodontal no quirúrgico.

PACIENTES Y MÉTODOS

Selección de los pacientes

El protocolo experimental del presente estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela. La población participante en la investigación fue distribuida en dos grupos. Grupo estudio: conformado por 11 pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica de moderada a severa (9 femeninos y 2 masculinos), y Grupo control: conformado por 11 pacientes sin enfermedad periodontal (8 femeninos y 3 masculinos). Los pacientes del grupo estudio fueron seleccionados entre los que asistieron por primera vez al postgrado de periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela, durante el período comprendido entre julio del 2009 y julio del 2010, y que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión: pacientes con historia clínica completa, exámenes de laboratorio, evaluación clínica-radiográfica y diagnóstico de periodontitis crónica de moderada a severa (inflamación gingival, con profundidades al sondaje ≥ 4 mm y pérdida de inserción ≥ 5 mm en más de 8 dientes y pérdida de hueso alveolar), sin distinción de edad ni género, sin antecedentes de enfermedades sistémicas ó ingesta de medicamentos 6 meses previos al estudio, tener valores de exámenes de laboratorio dentro de los límites de normalidad, además de haber dado su consentimiento para ser incluidos en la investigación; a este grupo se les realizó seguimiento hasta que todos completaran el tratamiento periodontal no quirúrgico consistente en: instrucciones para el control de biopelícula, tartrecotomías y raspado y alisado radicular. Las personas que conformaron el grupo control

debían estar periodontalmente sanas o con diagnóstico de gingivitis asociada a placa, no presentar profundidades al sondaje > 3 mm, ni pérdida de inserción y ósea en ningún diente; además de haber dado su consentimiento para ser incluidos en la investigación.

PARÁMETROS CLÍNICOS

La evaluación clínica de los pacientes estuvo basada en la medición de los siguientes parámetros clínicos: índice de placa (IP: 0 a 3) e índice gingival (IG: 0 a 3) (17), profundidad al sondaje (PS: en mm) y pérdida de inserción (PI: en mm). Todos los parámetros fueron medidos con una sonda periodontal "Goldman/Fox Williams" calibrada en milímetros. Los índices de placa y gingival fueron medidos en las caras vestibular, mesial y palatina o lingual de todos los dientes presentes en boca. La profundidad al sondaje (PS) y la pérdida de inserción (PI) fueron medidos en seis sitios por diente (mesio-vestibular, centro-vestibular, disto-vestibular, mesio-palatino/lingual, centro-palatino/lingual y disto-palatino/lingual) en todos los dientes presentes. Todas las mediciones fueron realizadas antes y después del tratamiento periodontal no quirúrgico (TPNQ), en el grupo estudio.

Muestra de fluido gingival crevicular (FGC)

Los dientes para la toma de muestra de FGC fueron escogidos entre los homólogos con mayores profundidades al sondaje (>4 mm) en cada cuadrante, excluyendo los terceros molares. Se seleccionaron cuatro dientes, uno por cuadrante, tomándose cuatro muestras con conos de papel estéril # 35 en cada diente antes y tres (3) meses después del TPNQ. Para la toma de la muestra se realizó aislamiento relativo utilizando eyector para la succión de saliva y colocando rollos de algodón alrededor de los dien-

tes seleccionados, luego se procedió a limpiar la superficie dentaria con un rollo de algodón para eliminar el exceso de biopelícula supragingival. Se introdujeron los conos de papel a nivel de la entrada de los sacos, en cuatro (4) sitios por diente (mesio-vestibular, disto-vestibular, mesio-palatino/lingual y disto-palatino/lingual), manteniéndolos insertados por 30 segundos, los conos visiblemente contaminados con sangre fueron descartados, posteriormente los conos se introdujeron en tubos "Eppendorf" de 1,5 mL y fueron refrigerados a -4°C hasta su procesamiento.

Procesamiento de la muestra

Los conos de papel fueron colocados con 100 μL de amortiguador A (12 mM Tris-HCl a pH 7,2, 0,1 M NaCl y 0,05% de Tween 20). A fin de recuperar el material presente en los conos, estos fueron agitados durante 30 minutos utilizando un "vortex", repitiendo este procedimiento 3 veces. Seguidamente los conos fueron eliminados del vial, y el contenido del mismo se centrifugó a 3000 g por 5 minutos. El sobrenadante obtenido fue almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

Para medir los niveles de metaloproteinasas (MMPs) presentes en el fluido crevicular gingival se utilizó un kit comercial de ELISA (Quantikine, R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, USA). Los niveles de MMPs fueron expresados en ng/mL.

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se usaron pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas, se fijó como nivel de significación ($p < 0,05$). En el procesamiento, tabulación y cálculos estadísticos descriptivos e inferenciales se empleó el Software SPSS para Windows en su Versión N° 13.

Se utilizó la prueba estadística paramétrica t-student para el análisis de los valores promedios de parámetros clínicos ob-

tenidos (índice gingival (IG), índice de placa (IP) y profundidad al sondaje (PS)), pero en el caso de la pérdida de inserción (PI) por no aproximarse a una distribución normal se empleó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, esta última también empleada al comparar los niveles de MMP-3 y MMP-8 entre los grupos. Además se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para el establecimiento de correlaciones entre las diferentes variables.

RESULTADOS

Un total de 11 pacientes con periodontitis crónica con un promedio de edad de $41,55 \pm 14,75$ y 11 controles sanos, con un promedio de edad de $40,09 \pm 10,98$ fueron incluidos en el estudio. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a género y los promedios de edad entre ambos grupos. Al congregar los pacientes por rango de edad se pudo apreciar que el 45,5% (5/11) en el grupo estudio y

54,5% (6/11) en el grupo control, se ubicó entre los 31 a 45 años de edad, 36,4% (4/11) en el grupo estudio y 27,3% (3/11) en el grupo control se ubicaron en el rango de >46 años y 18,2% (2/11) en el grupo estudio y 18,2% (2/11) en el grupo control se encontraron en el rango de 14 a 30 años, resultando una muestra bastante homogénea en cuanto al rango de edad.

La Tabla I compara los valores obtenidos de los parámetros clínicos evaluados (IG, IP, PS, PI) en los pacientes del grupo estudio pretratamiento y posterior a la terapia periodontal inicial, así mismo compara estos valores con los obtenidos en los pacientes del grupo control. Se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa en todos los parámetros clínicos en el grupo estudio previo al tratamiento periodontal, al compararlos con los valores posttratamiento. Al comparar los promedios registrados en el grupo estudio antes del tratamiento periodontal con los valores del grupo control, se obtuvieron diferencias es-

TABLA I
COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS EN LOS PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO PERIODONTAL NO QUIRÚRGICO Y CON EL GRUPO CONTROL

Pacientes	IG		IP		PS		PI	
	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS
GE antes TPNQ	2,14	0,50	1,73	0,48	4,39	0,79	5,18	1,18
GE después TPNQ	0,48	0,35	0,58	0,23	3,20	0,50	4,47	1,58
GC	0,46	0,46	0,63	0,52	1,89	0,43	1,91	0,53

Parámetro clínico	GE antes/después p*	GE antes/GC p*	GE después/GC p*
IG	<0,001	<0,001	0,9
IP	<0,001	<0,001	1
PS	<0,001	<0,001	<0,001
PI	<0,05	<0,001	<0,001

GE: Grupo estudio, GC: Grupo control, TPNQ: Tratamiento periodontal no quirúrgico.

IG: índice gingival, IP: índice de placa, PS: profundidad al sondaje, PI: pérdida de inserción.

*Comparación entre grupos (U Mann-Whitney) ($p < 0,05$).

estadísticamente significativas entre ambas categorías de pacientes. Cuando se contrastaron los datos del grupo estudio posterior a la TPNQ con los del grupo control, no se observaron diferencias en los IG e IP, pero PS y PI si mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control.

En cuanto a los niveles de MMP-3 y MMP-8 en FGC, en la Fig. 1 se observan los valores obtenidos en el grupo estudio antes (2,95 ng/mL y 8,29 ng/mL respectivamente) y después del TPNQ (1,11 ng/mL y 5,47 ng/mL) y en el grupo control (0,72 ng/mL y 1,53 ng/mL).

Se evidenció que los niveles de ambas MMPs disminuyeron después del tratamiento, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de MMP-3 y MMP-8 antes y después del tratamiento periodontal. Cuando se compararon los niveles de MMP-3 y MMP-8 antes del TPNQ en los pacientes con periodontitis crónica con los niveles de las mismas MMPs en el grupo control se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ambas MMPs.

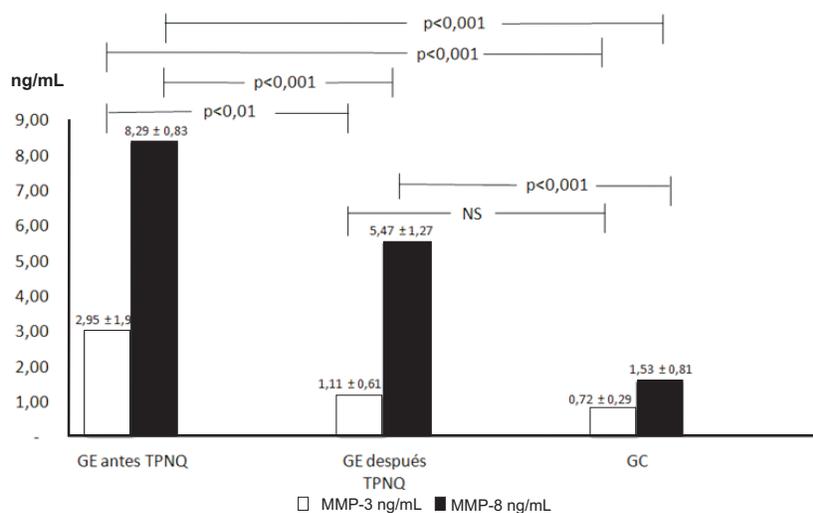
Por otro lado, al comparar los niveles de MMP-3 y MMP-8 después del tratamiento

periodontal no quirúrgico en los pacientes del grupo estudio, con los niveles de estas MMPs en los pacientes del grupo control, se observó que los valores de MMP-3 no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, con respecto a MMP-8 a pesar de que la disminución en los niveles fue considerable posterior al tratamiento, si se encontraron diferencias estadísticamente significativas al compararlos con los obtenidos en el grupo control (Fig. 1).

Al evaluar la asociación entre los promedios de los parámetros clínicos y los valores obtenidos para MMP-3 y MMP-8, no se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de MMP-3 y MMP-8 y los parámetros clínicos (IG, IP, PS, PI) medidos antes del tratamiento periodontal, después del tratamiento, ni entre los niveles de las MMPs y los parámetros clínicos en el grupo control.

DISCUSIÓN

La degradación de las fibras colágenas y otros componentes de la MEC en enfermedades inflamatorias como la periodontitis crónica, resulta principalmente de la actividad



GE: Grupo estudio, GC: Grupo control, TPNQ: Tratamiento periodontal no quirúrgico. Comparación entre grupos (U Mann-Whitney) (p<0,05), NS: no significativa

Fig. 1. Comparación entre los niveles de MMP-3 y MMP-8 en FGC de los pacientes con periodontitis crónica antes y después del tratamiento periodontal no quirúrgico.

de las metaloproteinasas (MMPs) originadas de diversos tipos de células (18) y niveles elevados han sido detectados en muestras de tejido gingival inflamado, saliva y FGC, proveniente de pacientes periodontalmente afectados (15). El presente estudio estuvo dirigido a determinar los niveles de MMP-3 y MMP-8 en FGC de pacientes con periodontitis crónica de moderada a severa antes de recibir tratamiento periodontal no quirúrgico, evaluar su comportamiento después de realizado raspado y alisado radicular, compararlos con las concentraciones de MMP-3 y 8 en pacientes periodontalmente sanos, y establecer la asociación entre los niveles de estas enzimas en FGC y diferentes parámetros clínicos evaluados en todos los pacientes.

Todas las mediciones de los parámetros clínicos evaluados (IG, IP, PS y PI) en los pacientes estudio, presentaron valores iniciales elevados y significativamente diferentes cuando se compararon con los observados en el grupo control, además estos valores en los pacientes con periodontitis crónica disminuyeron considerablemente posterior al tratamiento periodontal no quirúrgico, presentando todas diferencias significativas con respecto a los valores iniciales. Estos resultados son similares a los encontrados en un gran número de investigaciones que observaron mejoras significativas en los IG, IP, PS y PI en pacientes con periodontitis crónica posterior a recibir tratamiento de raspado y alisado radicular e instrucciones para el control de la placa dental (19-22) por lo que se sugiere que el tratamiento periodontal no quirúrgico es efectivo en reducir los parámetros clínicos que reflejan la extensión y severidad en la periodontitis crónica.

En el presente estudio se detectaron niveles elevados de MMP-8 y MMP-3 en FGC de los pacientes con periodontitis crónica antes de recibir tratamiento periodontal, encontrándose diferencias significativas al

ser comparados con los niveles obtenidos en los pacientes del grupo control periodontalmente sanos. Estos resultados guardan relación con lo reportado desde 1986 por Larivee y col. y Villela y col. en 1987 quienes expresaron que los niveles de MMPs pueden ser detectados en el fluido crevicular de pacientes con periodontitis en mucha mayor cantidad que en los pacientes controles (23, 24). Por su parte Ingman y col., al examinar los niveles de MMP-3 y 8 en FGC de pacientes con periodontitis del adulto (PA) y periodontitis juvenil localizada (PJJ), encontraron niveles de MMP-8 más altos que en los sujetos del grupo control, pero a diferencia de este estudio, bajos niveles de MMP-3 fueron detectados en todas las muestra de FGC estudiadas (25). Niveles más elevados de MMP-8 en pacientes con periodontitis crónica comparado con sujetos periodontalmente sanos han sido detectados no solo en FGC (13, 26) sino también al estudiar muestras de tejido gingival (27, 28) y de saliva (29).

Resultados similares a los obtenidos en esta investigación, en cuanto a los niveles elevados de MMP-3 en FGC en comparación a sitios sanos, fueron encontrados en estudios previos (18). Alpagot y col. en sus investigaciones concluyeron que los sitios con altos niveles de MMP-3 son de mayor riesgo para la progresión de periodontitis (30). Por su parte, Seguíer y col., al analizar muestras de tejido gingival de sitios sanos y sitios con periodontitis crónica severa encontraron que la cantidad de MMP-3 y el número de células inflamatorias encontradas se correlacionó inversamente y de forma significativa con el porcentaje de fibras colágenas detectadas (31). Los resultados de este estudio y otros reportados sugieren la importante relación que existe entre el incremento en las concentraciones de estas MMPs y la pérdida de tejido que ocurre durante la enfermedad periodontal.

Se pudo observar una disminución significativa tanto de los niveles de MMP-3 como de MMP-8 en el FGC de los pacientes con periodontitis crónica posterior al tratamiento periodontal no quirúrgico; resultados similares fueron reportados en estudios previos que encontraron una disminución significativa en los niveles MMP-8 (19, 32-34) y MMP-3 (35) en fluido gingival crevicular de pacientes con periodontitis crónica después del tratamiento con raspado y alisado radicular y una reducción más dramática después de meses de mantenimiento periodontal (36).

Los niveles de MMP-8 encontrados al inicio disminuyeron considerablemente después del tratamiento, pero sin alcanzar valores cercanos a los encontrados en los controles sanos, sin embargo los niveles de MMP-3 obtenidos posterior a la TPNQ en los pacientes estudio sí alcanzaron valores próximos a los encontrados en los individuos periodontalmente sanos. Resultados semejantes fueron obtenidos por Ingman y col., al analizar muestras de tejido gingival posterior al tratamiento de pacientes con raspado y alisado radicular, encontrado inmunoreactividad para la neutrófilo colagenasa (MMP-8), mientras que para MMP-3 y MMP-1 no detectaron inmunoreactividad al igual que en las muestras de tejido de los pacientes controles, concluyendo que la MMP-8 es la principal colagenasa presente en el tejido gingival de pacientes con PC (15).

Los resultados obtenidos posterior al TPNQ en cuanto a la reducción de la MMP-3, probablemente sea consecuencia del origen de esta metaloproteinasa, el cual al parecer es principalmente de fibroblastos activados por citocinas durante la respuesta inmune-inflamatoria, lo que decrece considerablemente al reducir el factor irritativo de la placa subgingival posterior al raspado y alisado radicular. Esto último también provoca la disminución en los niveles de

MMP-8, cuya principal producción proviene de los leucocitos PMN; pero estas células, al ser la primera línea de defensa y estar en constante asociación con el epitelio del surco y presente en el FGC manteniendo interacción con las bacterias de la biopelícula y sus factores de virulencia, podría ser el motivo de que la MMP-8 se observe en más altos niveles, y además, de que su concentración no disminuya hasta valores semejantes a los encontrados en los pacientes sanos.

Al correlacionar los parámetros clínicos evaluados con los niveles de MMP-3 y MMP-8 en FGC, en todos los pacientes (estudio y control), no se encontraron correlaciones significativas antes del tratamiento, posterior al tratamiento, ni en los pacientes controles, probablemente como consecuencia del tamaño de la muestra estudiada. Similares estudios previamente realizados, que contaron con muestras de pacientes de mayor tamaño obtuvieron fuerte correlación entre los niveles de MMP-3 y MMP-8 y parámetros clínicos como IG, IP, PS, PI (28-30). Se ha observado una correlación positiva moderada de los niveles de MMP-8, principalmente con los signos de inflamación, es decir, porcentaje de sitios con sangramiento al sondaje, IG y volumen de FGC (26). En un estudio doble ciego durante el mantenimiento periodontal, Reinhardt y col. concluyeron que incrementos en los niveles de MMP-8 en el FGC de sitios de profundidad moderada, durante el mantenimiento periodontal, tiene el potencial de identificar pacientes vulnerables a presentar pérdida de inserción progresiva (37).

Los resultados obtenidos en este estudio donde se observaron niveles iniciales elevados de MMP-3 y MMP-8 en el FGC de los pacientes con periodontitis crónica, con disminución posterior al tratamiento inicial, y la diferencia en los niveles entre pacientes sanos y enfermos, sugiere la importante participación de estas MMPs en la degradación del tejido durante la periodonti-

tis crónica, y su posible utilización como marcadores para el seguimiento de los pacientes con enfermedad periodontal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratorio de Biotecnología Aplicada a la Odontología (CEBAO) por aportar toda su infraestructura para llevar a cabo el procesamiento de las muestras, y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV (CDCH) por el financiamiento del proyecto No PG-10-7070-2007.

REFERENCIAS

1. **Van Dyke T, Lester M, Shapira L.** The role of the host response in periodontal disease progression: implications for future treatment strategies. *J Periodontol* 1993; 64: 792-806.
2. **Page R.** Periodontal disease: a new paradigm. *J Dent Education* 1998; 62: 812-821.
3. **Genco R.** Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol* 1992; 63: 338-355.
4. **Socransky, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent R.** Microbial complex in subgingival plaque, *J Clin Periodontol* 1998; 25:134-144.
5. **Eley B.** Advances in periodontal diagnosis: 5 Potencial inflammatory and immune markers. *Br Dent J* 1998; 184: 220-223.
6. **Figueredo C, Ribeiro M, Fischer R, Gustafsson A.** Increased Interleukin-1 β concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J Periodontol* 1999; 70:1457-1463.
7. **Nagase H.** In *Zinc metalloproteinases in health and disease* (Hooper, N.M.,ed) Taylor & Francis, London; 1996:1-21.
8. **Birkedal-Hansen H, Moore W, Bodden M, Windsor L, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler J.** Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 197-250.
9. **Reynolds J, Meikle M.** Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontology* 2000 1997; 14:144-157.
10. **Holla L, Fassmann A, Muzik J, Vanek J, Vasku A.** Functional polymorphisms in the matrix metalloproteinase-9 gene in relation to severity of chronic periodontitis. *J Periodontol* 2006; 77:1850-1855.
11. **Haerian A, Adonogianaki E, Mooney J, Docherty J, Kinane D.** Gingival crevicular stromelysin, collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinase levels in healthy and diseased sites. *J Clin Periodontol* 1995; 22:505-509.
12. **Makela M, Salo T, Uitto V, Larjava H.** Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res* 1994; 73:1397-1406.
13. **Nomura T, Ishii, Oishi Y, Kohama H, Hara K.** Tissue inhibitors of metalloproteinases level and collagenase activity in gingival crevicular fluid: the relevance to periodontal diseases. *Oral Dis* 1998; 4: 231-240.
14. **Kinane D, Berglundh T, Lindhe J.** Interacciones entre el huésped y el parásito en la enfermedad periodontal. En: Lindhe, Karring, Lang, eds. *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. Buenos Aires: Médica panamericana; 2005. P 157-187.
15. **Ingman T, Sorsa T, Michaelis J, Konttinen Y.** Immunohistochemical study of neutrophil and fibroblast type collagenases and stromelysin-1 in adult periodontitis. *Scand J Dent Res* 1994; 102:342-349.
16. **Ruwanpura S, Noguchi K, Ishikawa I.** Prostaglandin E2 regulates Interleukin-1 β -induced matrix metalloproteinase-3 production in human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2004; 83:260-265.
17. **Löe H.** The gingival index, the placa index and the retention index system. *J Periodontol* 1967; 38:610-616.
18. **Soell M, Elkaim R, Tenenbaum H.** Cathepsin C, matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from peri-

- odontitis-affected patients. *J Dent Res* 2002; 81:174-178.
19. **Hernandez M, Gamonal J, Tervahartiala T, Mäntylä P, Rivera O, Dezerega A, Dutzan N, Sorsa T.** Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. *J Periodontol* 2010; 81:1644-1652.
 20. **Tüter G, Serdar M, Kurtis B, Walker S, Atak A, Toyman U, Pinar S, Aykan T.** Effects of scaling and root planning and subantimicrobial dose doxycycline on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-8, -13 and serum levels of HsCRP in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2010; 81:1132-1139.
 21. **Rosalem W, Rescala B, Teles R, Fischer R, Gustafsson A, Figueredo C.** Effect of non-surgical treatment on chronic and aggressive periodontitis: clinical, immunologic, and microbiologic findings. *J Periodontol* 2011; 82:979-989.
 22. **Auyeung L, Wang P, Lin R, Hsieh C, Lee P, Zhuang R, Chang H.** Evaluation of periodontal status and effectiveness of non-surgical treatment in patients with type 2 diabetes mellitus in Taiwan for a 1-year period. *J Periodontol* 2012; 83:621-628.
 23. **Larivee J, Sodek J, Ferrier J.** Collagenase and collagenase inhibitor activities in crevicular fluid of patients receiving treatment for localized juvenile periodontitis. *J Periodont Res* 1986; 21:702-715.
 24. **Villela B, Cogen R, Bartolucci A, Birkedal-Hansen H.** Collagenolytic activity in crevicular fluid from patients with chronic adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and gingivitis, and from healthy control subjects. *J Periodont Res* 1987; 22:381-389.
 25. **Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane D, Konttinen Y, Sorsa T.** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 1127-1132.
 26. **Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, Haffajee A.** Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol* 2010; 81:89-98.
 27. **Tervahartiala T, Pirilä E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tüter G, Kallio P, Törnwall J, Srinivas R, Konttinen YT, Sorsa T.** The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2,-8,-13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res* 2000; 79:1969-1977.
 28. **Kumar M, Vamsi G, Sripriya R, Sehgal P.** Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and 9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. *J Periodontol* 2006; 77:1803-1808.
 29. **Rai B, Kharb S, Jain R, Anand S.** Biomarkers of periodontitis in oral fluids. *J Oral Sci.* 2008; 50:53-56.
 30. **Alpagot T, Bell C, Lundergan W, Chambers D, Rudin R.** Longitudinal evaluation of GCF MMP-3 and TIMP-1 levels as prognostic factors for progression of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 353-359.
 31. **Séguier S, Gogly B, Bodineau A, Godeau G, Brousse N.** Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? *J Periodontol* 2001; 72:1398-1406.
 32. **Sorsa T, Hernandez M, Leppilähti J, Munjal S, Netuschil L, Mäntylä P.** Detection of gingival crevicular fluid MMP-8 levels with different laboratory and chair-side methods. *Oral Dis* 2010; 16:39-45.
 33. **Mäntylä P, Stenman M, Kinane D, Salo T, Suomalainen K, Tikanoja S, Sorsa T.** Monitoring periodontal disease status in smokers and no-smokers using a gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 specific chair-side test. *J Periodontol Res* 2006; 41:503-512.
 34. **Han B, Emingil G, Özdemir G, Tervahartiala T, Vural C, Atilla G, Baylas**

- H, Sorsa T. Azithromycin as an adjunctive treatment of generalized severe chronic periodontitis: clinical, microbiologic, and biochemical parameters. *J Periodontol* 2012; 83: 1480-1491.
35. Haerian A, Adonogianaki E, Mooney J, Manos A, Kinane DF. Effects of treatment on gingival crevicular collagenase, stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases and their ability to predict response to treatment. *J Clin Periodontol*. 1996; 23:83-91.
36. Kinane D, Darby I, Said S, Luoto H, Sorsa T, Tikanoja S, Mäntylä P. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontol Res*. 2003; 38:400-404.
37. Reinhardt R, Stoner J, Golub L. Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis. *J Periodontol* 2010; 81: 251-259.