



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
ESCUELA DE GRADUADOS  
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS MENCIÓN PATOLOGÍA Y  
MEDICINA ORAL**

**MARCADORES DE METABOLISMO ÓSEO EN FLUIDO CREVICULAR  
GINGIVAL COMO POTENCIAL HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA DE  
ENFERMEDADES INFLAMATORIAS CRÓNICAS DEL PERIODONTO  
MARGINAL Y APICAL**

**Mauricio Baeza Paredes**

**TRABAJO DE INVESTIGACION  
REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGISTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos**

**TUTOR ASOCIADO**

**Prof. Dr. Rolando Vernal Astudillo**

**Santiago - Chile  
2014**

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
ESCUELA DE GRADUADOS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS MENCIÓN PATOLOGIA Y MEDICINA ORAL

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Magíster en Ciencias Odontológicas presentada por el candidato

**Mauricio Baeza Paredes**

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, mención Patología y Medicina Oral en examen rendido el 04 de Diciembre de 2014.

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

Prof. Dr. Alejandro Escobar A.

Prof. Dr. Juan Pablo Rodríguez V.

Prof. Dr. Jorge Gamonal A.

*“Si no hay dudas, no hay progreso.”*

*Charles Darwin.*

## Agradecimientos

El más profundo y sincero agradecimiento a mi tutora del programa de magister y tutora de la presente tesis, Prof. Dra. Marcela Hernández por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa, pero sobre todo por la motivación y la oportunidad de formar parte de su línea de investigación.

Al equipo del Laboratorio de Biología Periodontal, en especial a Leslie, Andrea, Pablo y Jocelyn por el apoyo y valiosa colaboración.

Al equipo de bioestadística de la Escuela de Salud Pública, en especial a Macarena Valdés por sus conocimientos y apoyo estadístico.

A Decanato por la oportunidad de realización del programa de magister gracias al sistema de becas creado para potenciar la formación continúa de académicos de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

A mis amigos y compañeros de lucha con quienes creamos la “Red de Investigadores en Postgrado Campus Norte Universidad de Chile”, José Luis, Roger, Gonzalo, Héctor, Mauricio y en especial a nuestra compañera Jeanett Vera que nos ha dejado un gran legado y una extraordinaria enseñanza de vida.

Finalmente a mi familia, en especial a mi madre y a mi padre por su entrega inagotable y su amor inconmensurable.

## REFERENCIAS DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

ABC:	Área Bajo la Curva
Activación MMP-9:	Relación entre formas activas v/s proforma + formas activas
BSA: (en inglés)	Albúmina sérica de bovino
CPT:	Concentración de proteínas totales
DKK-1:	Dickkopf-1
DS:	Desviación estándar
E:	Especificidad
FCG:	Fluido Crevicular Gingival
IC:	Intervalo de Confianza
MMPs:	Metaloproteinasas de la Matriz
MMP-8 (ELISA): (en inglés)	MMP-8 medido con ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
MMP-8 (IFMA): (en inglés)	MMP-8 medido con ensayo inmunofluorométrico.
MMP-9 a:	Forma activa de MMP-9
NIC:	Nivel de Inserción Clínica
NOR:	Nivel Óseo Radiográfico
ON:	Osteonectina.
OPG:	Osteoprotegerina
PAA:	Periodontitis Apical Asintomática
PS:	Profundidad al sondaje.
PC:	Periodontitis Crónica
ProMMP-2:	Proforma de MMP-2
ProMMP-9:	Proforma de MMP-9
PTN:	Periostina
ua:	Unidades arbitrarias (píxeles)
RANKL: (en inglés)	Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa B
RIQ:	Rango intercuartílico
ROC: (en inglés)	Característica Operativa del Receptor
S:	Sensibilidad
SS:	Sangrado al Sondaje
TLA:	Tamaño Lesión Apical

TNF: (en inglés)

Factor de Necrosis Tumoral

TRAP:(en inglés)

Fosfatasa ácida resistente a tartrato

VPN:

Valor predictivo negativo

VPP:

Valor predictivo positivo

## Contenido

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Enfermedades del periodonto marginal y apical.....	1
2. Marcadores de metabolismo óseo.....	2
2.1 Metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) -2, 8 y -9.....	3
2.2 Dickkopf-1 (DKK-1).....	6
2.3 Osteonectina (ON).....	7
2.4 Periostina (PTN).....	7
2.4 Fosfatasa Ácida Resistente a Tartrato (TRAP).....	8
2.5 Osteoprotegerina (OPG).....	9
3. Biomarcadores en FCG como complemento al diagnóstico clínico-radiográfico....	10
HIPÓTESIS .....	14
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
MÉTODO.....	16
1. Pacientes.....	16
2. Obtención de Muestra de FCG y Elución .....	18
3. Análisis de eluidos en FCG .....	20
3.1 Determinación de la Concentración de Proteínas Totales.....	20
3.2 Detección y Actividad Gelatinolítica de MMP -2 y -9 .....	20
3.3 Detección y Niveles de MMP-8 .....	21

3.4	Productos de Metabolismo Óseo .....	21
4.	Análisis Estadístico .....	22
RESULTADOS .....		23
1.	Variables demográficas, clínicas y radiográficas .....	23
2.	Marcadores de metabolismo óseo.....	25
2.1	Concentración de proteínas totales.....	25
2.2	Detección, actividad gelatinolítica de MMPs -2 -9 y niveles de MMP-8 .....	26
2.3	Detección y niveles de DKK-1, ON, PTN, TRAP y OPG.....	29
3.	Asociación de marcadores con variables clínico-radiográficas y hábito tabáquico .....	32
3.1	Asociación de marcadores con variables clínico-radiográficas y hábito tabáquico en sujetos con Periodontitis Crónica.....	32
3.2	Asociación de marcadores con variables radiográficas y hábito tabáquico en sujetos con Periodontitis Apical Asintomática .....	36
4.	Análisis de precisión diagnóstica.....	38
4.1	Análisis de precisión diagnóstica para el diagnóstico de Periodontitis Crónica .....	38
4.2	Análisis de precisión diagnóstica para el diagnóstico de Periodontitis Apical Asintomática. ....	42
DISCUSIÓN.....		45
CONCLUSIONES:.....		52
RESUMEN.....		53

BIBLIOGRAFÍA..... 56

Anexo 1 ..... 73

Anexo 2 ..... 74

Anexo 3 ..... 75

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. Enfermedades del periodonto marginal y apical.**

En el contexto más amplio, las enfermedades del periodonto corresponden a un amplio grupo de entidades clínicas de carácter infeccioso, inflamatorio, metabólico y neoplásico, que pueden afectar los tejidos periodontales, tanto a nivel marginal como apical del diente (1, 2). Las entidades más prevalentes corresponden a lesiones de naturaleza inflamatoria causadas por microorganismos que se acumulan en el área del margen gingival (3). Dentro de ellas la periodontitis crónica (PC) constituye una de las formas más comunes de enfermedad periodontal marginal, afectando a un alto porcentaje de la población adulta (4, 5). Otra fuente de infección e inflamación frecuente que puede afectar los tejidos periodontales proviene de procesos sépticos pulpares, dando origen a otra gama de entidades patológicas que afectan al periodonto a nivel del periápice dentario y que en términos generales se definen como periodontitis apicales (6). La PC y la periodontitis apical asintomática (PAA) constituyen las principales enfermedades inflamatorias crónicas con compromiso óseo de los tejidos periodontales y son consideradas una de las causas más significativas de pérdida dentaria en adultos, representando un grave problema de salud pública mundial (5, 7).

Ambas patologías se originan como una manifestación de injuria tisular localizada, que presenta signos bien definidos de inflamación crónica con destrucción del periodonto y reabsorción ósea local en grado variable, y progresan producto de la liberación sostenida de mediadores inflamatorios que comprenden citoquinas, quimioquinas, factores crecimiento y enzimas hidrolíticas. La destrucción característica durante estos procesos osteolíticos resulta principalmente de la activación de la respuesta inmuno-inflamatoria del hospedero frente a la continua exposición bacteriana y por lo tanto, el carácter destructivo de la enfermedad está determinado principalmente por la naturaleza inflamatoria crónica de estas respuestas. Considerando que el desarrollo y progresión de ambas patologías se centra en la pérdida ósea, la caracterización de mediadores asociados con osteólisis, tales como metaloproteinasas de matriz (MMPs), citoquinas y productos de la matriz ósea en fluidos orales, el análisis de estos fluidos podría reflejar los estados de salud-enfermedad de los tejidos periodontales y por tanto, contribuir como complemento al diagnóstico clínico (8).

## **2. Marcadores de metabolismo óseo**

Un aspecto fundamental en la patogénesis de estas enfermedades inflamatorias es el aumento de la tasa metabólica ósea total, que en último término, genera un desequilibrio a favor de la actividad catabólica con la pérdida sostenida del tejido óseo comprometido.

Dentro de los marcadores de metabolismo óseo más ampliamente estudiados en enfermedades inflamatorias crónicas con compromiso óseo, encontramos:

### **2.1 Metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) -2, 8 y -9**

Entre las enzimas involucradas en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas del periodonto marginal y apical, se han estudiado especialmente las MMPs, debido a que son capaces de degradar los componentes del periodonto y eventualmente también podrían jugar un importante rol en la modulación de la respuesta inmuno-inflamatoria (9). Las MMPs son una familia de enzimas estructuralmente relacionadas que degradan la matriz extracelular (MEC), incluyendo componentes de las membranas basales, y actúan sobre diversas moléculas bioactivas, tales como citoquinas, quimioquinas, receptores celulares de superficie, hormonas, defensinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento, ligandos apoptóticos, factores angiogénicos y otras enzimas proteolíticas. Estos hallazgos, ligan la actividad de las MMPs con la modulación de la respuesta inmunoinflamatoria y la activación de complejas cascadas proteolíticas que podrían regular y autoperpetuar la inflamación periodontal (10). En base a la especificidad sobre el sustrato, similitud de secuencia y organización de sus dominios las MMPs de vertebrados se dividen en 6 grupos: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas, MMP transmembrana (MT-MMPs) y otras, como las MMPs-12, -19, -20, -

22, -23 y -28 (11, 12). MMP-8 forma parte del grupo de las colagenasas, mientras que MMP-2 (gelatinasa A) y MMP-9 (gelatinasa B) forman parte del grupo de las gelatinasas.

El colágeno tipo I es el principal componente de la matriz extracelular del tejido periodontal tanto a nivel del ligamento periodontal como del hueso alveolar. La degradación del colágeno tipo I, por lo tanto, se considera entre los factores claves en la patogénesis de las periodontitis marginales y apicales. La MMP-8 es la colagenasa intersticial predominante en sujetos afectados con periodontitis (13). En un estudio reciente se observó en ratones deficientes para MMP-8 una importante reducción de la expresión de la quimioquina LIX/CXCL5 en un modelo experimental de periodontitis inducida por *Porphyromonas Gingivalis*. Estos datos confirman el concepto de que MMP-8, además de participar en degradación del colágeno tipo I, también juega un rol central en la regulación de la respuesta inflamatoria durante el curso de la enfermedad periodontal (14). Diversos estudios han demostrado el rol central de MMP-8 en la patogenia de procesos inflamatorios crónicos del periodonto marginal y apical, considerándose como un potencial biomarcador diagnóstico, aunque no se ha demostrado con claridad su rol predictivo en la progresión de estas patologías (15, 16, 17).

La MMP-2 degrada principalmente gelatina, que corresponde a colágeno desnaturado. Además, degrada colágenos tipo I, II, III y IV; este último constituye un componente

fundamental de las membranas basales, lo que le otorga un importante rol durante la metástasis en cáncer (12). Se ha reportado que MMP-2 y MMP-9 son expresadas en el tejido óseo donde participan en la activación del ciclo de reabsorción-formación involucrado en la remodelación ósea y en procesos patológicos de destrucción ósea (18-22). A nivel óseo se requiere la degradación de colágeno para el acceso del osteoclasto al sitio de reabsorción, proceso dependiente en parte de la actividad gelatinolítica de las MMPs. Los productos resultantes de la proteólisis del colágeno intersticial generados por las colagenasas se desnaturalizan espontáneamente a temperatura ambiente y se transforman en gelatina, la cual es susceptible a la acción de las MMPs -2 y -9 (18, 19). De este modo, la acción sinérgica de MMP-8, MMP-2 y MMP-9 podría tener un rol fundamental en la destrucción del tejido óseo periodontal, y particularmente del colágeno tipo I, principal componente orgánico de su matriz extracelular. Además, se ha observado que las MMPs pueden activarse, mediante proteólisis limitada. Existe evidencia de que MMP-9 activa a proMMP-2, proMMP-9 y proMMP-13, mientras que ésta última a su vez puede activar a proMMP-9. Finalmente, MMP-8 podría ser activada a través de ácido hipocloroso producto de la actividad de la mieloperoxidasa y por MMP-14 (23-25). De este modo, la interconexión que se produce en la activación proteolítica entre MMPs, representa una cascada de amplificación que podría perpetuar la destrucción tisular (9, 24).

## **2.2 Dickkopf-1 (DKK-1)**

La investigación reciente ha demostrado que muchas proteínas son esenciales para la proliferación, diferenciación y supervivencia de los osteoblastos. Son de particular importancia la de tipo wingless y la integrasa 1 (vía de la Wnt/b-catenina) (26, 27). DKK-1 es un inhibidor de la vía de señalización Wnt canónica, bloqueando la activación y proliferación de los osteoblastos. En la artritis reumatoide se ha observado un aumento de los niveles séricos de DKK-1 asociados con una elevada actividad de los osteoclastos y la degradación tisular. Por otra parte, el bloqueo de DKK-1 tiene como consecuencia la inhibición de las erosiones óseas en un modelo inflamatorio de ratón (28). DKK-1 es un regulador de la masa ósea y remodelación articular que puede constituir un prometedor blanco terapéutico en la osteoporosis. Se ha propuesto la inhibición de DKK-1 mediante anticuerpos monoclonales para el tratamiento de la osteoporosis (29, 30). En línea con lo anterior, niveles elevados de DKK-1 en la médula ósea, plasma y sangre periférica se asocian con la presencia de lesiones osteolíticas en pacientes con mieloma múltiple (31). A pesar de la asociación entre DKK-1 y pérdida ósea (32), no hay evidencia disponible de su potencial rol de en el desarrollo de PC y PAA.

### **2.3 Osteonectina (ON)**

La ON es una glicoproteína constituyente del tejido óseo con gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita. Representa el 25% de las proteínas no colágenas. Se cree que interviene en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células. En el hueso es necesaria para la mineralización normal. Basándose en resultados anteriores, se ha propuesto un papel de la ON en facilitar la maduración de procolágeno de tipo I y de este modo promover la deposición de colágeno y la formación de fibras (33, 34). De este modo, ON es fundamental en los procesos de remodelado y regeneración del tejido óseo (35-38). A nivel periodontal, la expresión de ON se encuentra en el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar (35, 39). En pacientes con periodontitis crónica, se han reportado aumentos en los niveles salivales de esta glicoproteína constituyente ósea en asociación con pérdida de hueso alveolar (40), sin embargo no hay evidencia de variación de ON en fluidos orales de sujetos con PAA.

### **2.4 . Periostina (PTN)**

La PTN, inicialmente identificada como una molécula de adhesión de los osteoblastos, desempeña múltiples funciones en la regulación de la diferenciación, adhesión, migración, invasión y supervivencia en una gran variedad de tipos de células incluyendo

fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, osteoblastos y células musculares lisas. La proteína es altamente homóloga a betaig-h3, una molécula inducida por el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), que promueve la adhesión y propagación celular. Se sugiere que la PTN puede jugar un papel en el reclutamiento y la unión de precursores de osteoblastos en el periostio (41), como también en la invasión celular de sujetos afectados con metástasis óseas de diferentes tipos de cáncer (42-45). Sin embargo, se desconoce la presencia de PTN en el FCG y su potencial rol en las distintas formas de enfermedad periodontal.

### **2.5 Fosfatasa Ácida Resistente a Tartrato (TRAP)**

Los osteoclastos contienen una fosfatasa ácida resistente a la inhibición por ácido tártrico. Esta fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), juega un rol clave en la reabsorción ósea. Los niveles plasmáticos de TRAP están elevados en pacientes con enfermedades óseas metabólicas que cursan con un aumento en la velocidad del remodelado óseo. TRAP es el único de los marcadores de remodelado que evalúa la actividad directa del osteoclasto, ya que el resto de los marcadores de reabsorción normalmente refleja el grado de destrucción de la matriz ósea (46, 47). A nivel periodontal, un estudio reciente demostró un aumento en los niveles de TRAP, de productos finales de la degradación del colágeno tipo I y de MMP-8, -9 y 13,

relacionados con metabolismo óseo, en saliva de sujetos con periodontitis crónica en comparación con controles sanos (48); sin embargo, no existen reportes de niveles de TRAP en FCG en sujetos con enfermedades inflamatorias crónicas del periodonto marginal y apical.

## **2.6 Osteoprotegerina (OPG)**

La OPG es un miembro de la superfamilia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) que funciona como un factor soluble secretado por los osteoblastos no anclados a la membrana. Actúa como receptor señuelo, uniéndose al Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa B (RANKL) y neutralizándolo; mediante este mecanismo, OPG ocupa e impide su unión con el Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa B (RANK). OPG inhibe la diferenciación, supervivencia y fusión de los precursores de osteoclastos, bloquea la activación de los osteoclastos maduros e induce a su apoptosis (49). Si hay suficiente OPG en el medio, este se unirá al RANKL, impidiendo su interacción con el receptor RANK de los precursores osteoclasticos, lo que frenará el proceso de funcionalización osteoclastica (50). La sobreexpresión de OPG en ratones transgénicos se asocia con osteopetrosis severa, similar a lo que sucede en ratones nulos para RANK y RANKL. En contraste, la disminución de la expresión de OPG se asocia con aumento de la actividad osteoclastica y osteoporosis. La administración parenteral de OPG recombinante en roedores normales produce aumento de la masa ósea y

previene la pérdida ósea inducida por ovariectomía sin los efectos colaterales esqueléticos y extra esqueléticos (51).

En relación con las enfermedades periodontales, se ha observado que el radio RANKL/OPG en FCG se encuentra aumentado en comparación con sujetos sanos; a su vez, este aumento en la tasa RANKL/OPG se ha correlacionado con variables clínicas periodontales, tales como profundidad al sondaje y nivel de inserción clínico (52). A diferencia de PC, no hay reportes de variación de OPG en sujetos con PAA.

### **3. Biomarcadores en FCG como complemento al diagnóstico clínico-radiográfico.**

En la actualidad, el diagnóstico clínico-radiográfico representa el modelo básico para el diagnóstico periodontal a nivel marginal y apical. Clínicamente, el resultado del daño tisular en el caso de PC puede reflejarse en un aumento en las profundidades al sondaje con pérdida de los niveles de inserción clínica como resultado de la migración apical del epitelio de unión dentogingival en conjunto con la reabsorción de la cresta ósea alveolar (18). A su vez, la pérdida del nivel óseo de la cresta alveolar puede evidenciarse radiográficamente, así como también la lesión osteolítica perirradicular producto del daño tisular en pacientes con PAA (53).

En PC, el examen clínico incluye el sondeo de la profundidad de las bolsas, sangrado al sondaje, niveles de inserción clínica, y nivel óseo alveolar. Aunque son métodos relativamente no invasivos, la evaluación clínico-radiográfica refleja el daño acumulado de episodios anteriores de destrucción del tejido periodontal, y por lo tanto, carece de la capacidad para identificar a los pacientes altamente susceptibles que estén en riesgo de futura progresión. El desafío entonces se centra en la necesidad de diseñar métodos diagnósticos innovadores que permitan reflejar el estado actual del sitio periodontal como complemento a los métodos clínico-radiográficos existentes (54). De modo similar, en el caso de los pacientes con PAA, el estudio radiográfico se basa en el análisis de una imagen bidimensional que refleja el daño acumulado, sin embargo no permite evaluar cambios en los tejidos perirradiculares en el corto plazo (53, 55-58). Por otra parte, las muestras que se utilizan actualmente en el estudio de las lesiones periapicales, como la biopsia obtenida tras una exodoncia o apicectomía del diente en cuestión, así como también el exudado periapical obtenido a través del canal radicular (59), constituyen métodos invasivos que no permiten el seguimiento de dientes con PAA y por lo tanto su evaluación longitudinal.

El fluido crevicular gingival (FCG) constituye un extravasado plasmático que puede obtenerse de forma no invasiva desde el surco gingival. Está constituido por moléculas derivadas del suero, células hospederas del periodonto, leucocitos y productos

bacterianos provenientes de la placa subgingival. En condiciones inflamatorias, este fluido constituye un exudado y por tanto contiene una alta concentración de proteínas totales, así como componentes derivados de los procesos de destrucción local de la matriz extracelular, y ofrece un gran potencial como fuente de factores que pueden asociarse con actividad metabólica total y con el estado actual de salud o enfermedad de los tejidos periodontales (60-64).

Respecto de los marcadores propuestos, existen estudios que han demostrado cambios en la composición del FCG, con aumentos en los niveles y/o actividad de MMP -2, MMP-9, y particularmente de MMP-8 y concentración de proteínas totales, reflejo del estado inflamatorio subyacente en PC (54, 65-67), apoyando ampliamente su análisis como potencial método complementario al diagnóstico y a su monitoreo clínico. A pesar de la similitud en términos de su patogénesis, la evidencia es aún más limitada en relación con la PAA, sin embargo existen antecedentes preliminares que sostienen cambios en la composición del FCG, particularmente respecto de niveles y actividad e MMP-9, también en esta patología (64, 68-70). A su vez, el análisis de algunos marcadores óseos en FCG como ON, TRAP y OPG, constituye un campo aun pobremente explorado (71, 72) y en otros casos, como DKK-1 y PN, no existe evidencia en la actualidad. Finalmente, no existen estudios que evalúen en forma simultánea los posibles cambios en la composición del FCG de dientes de sujetos con PC y PAA. El análisis de marcadores biológicos en FCG podría contribuir como método

complementario al diagnóstico clínico-radiográfico y monitoreo de estas patologías, así como también a la evaluación de su respuesta al tratamiento.

El propósito del presente estudio fue comparar niveles de un set de biomarcadores directos e indirectos de metabolismo óseo incluyendo concentración de proteínas totales, actividad gelatinolítica de MMPs -2 y -9, y niveles de MMP-8, DKK-1, ON, PTN, TRAP y OPG en FCG proveniente de dientes de sujetos con PC, PAA y controles sanos, a su vez asociar estos marcadores biológicos con las variables clínico-radiográficas respectivas a cada condición patológica, y finalmente determinar en cada uno de ellos la precisión diagnóstica para evaluar su potencial utilidad como método complementario al diagnóstico clínico-radiográfico de estas patologías.

## **HIPOTÉISIS**

Durante el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas de los tejidos periodontales existe un aumento del metabolismo óseo con predominio de la actividad catabólica que se puede reflejar en el FCG.

Proponemos que existe un aumento de la concentración de proteínas totales, de la actividad gelatinolítica de MMPs -2 y -9, de los niveles de MMP-8, DKK-1, ON, PTN, TRAP y OPG en FCG de sitios de dientes de sujetos afectados con PC como de sitios de dientes de sujetos afectados con PAA, en comparación con sujetos sanos, que contribuyen a diferenciar el estado de salud periodontal en términos diagnósticos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar niveles y precisión diagnóstica de un set de marcadores de metabolismo óseo en FCG de sitios de dientes de sujetos con PC, PAA y sanos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.** Determinar y comparar la concentración de proteínas totales, la detección y actividad gelatinolítica de MMPs -2 y -9, y la detección y niveles de MMP-8, DKK-1, ON, PTN, TRAP y OPG en FCG de sitios de dientes de sujetos con PC, PAA y sanos.
- 2.** Asociar la concentración de proteínas totales, la detección y actividad gelatinolítica de MMPs -2 y -9, y los niveles de MMP-8, DKK-1, ON, PTN, TRAP y OPG con profundidad al sondaje, nivel de inserción clínica, nivel óseo radiográfico y hábito tabáquico en sujetos con PC y con tamaño de lesión apical y hábito tabáquico en sujetos con PAA, respectivamente.
- 3.** Determinar la precisión diagnóstica de la concentración de proteínas totales, de la actividad gelatinolítica de MMPs -2 y -9, y de los niveles de MMP-8, DKK-1, ON, PTN, TRAP y OPG en FCG de sujetos con PC y PAA.

## **MÉTODO**

### **1. Pacientes**

En el presente estudio analítico transversal, los pacientes fueron seleccionados de las Clínicas de Periodoncia y de Endodoncia de la Escuela de Graduados de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Se incluyeron sujetos con diagnóstico clínico de PC moderada a severa según criterios definidos previamente (73), con un mínimo de 14 dientes naturales, excluyendo terceros molares, donde 5 o más sitios presenten profundidad al sondaje mayor o igual a 5 mm, con pérdida de inserción mayor o igual a 3 mm y extensiva pérdida ósea radiográfica. Se excluyeron aquellos sujetos que presentaron PAA concomitante.

De modo similar, se incluyeron sujetos con diagnóstico clínico de PAA según los criterios previamente definidos (74) en dientes uni o multirradiculares con formación radicular completa, evidenciada por la presencia de lesión apical radiográfica >3mm en dientes con caries extensa y pruebas clínicas de sensibilidad pulpar negativas. Los dientes incluidos no presentaron sintomatología dolorosa, ni enfermedades del periodonto marginal.

Finalmente, se incluyeron voluntarios sanos como grupo control, que presentaron una profundidad al sondaje igual o menor a 3 mm en todos los sitios, sangrado al sondaje

(SS) menor al 10%, índice gingival menor a 0,5 y ausencia de diagnóstico clínico de PAA (75). Los criterios de exclusión para todos los sujetos fueron tratamiento periodontal o endodóntico previo a la examinación clínica, enfermedad sistémica y uso de antibióticos y antiinflamatorios no esteroideos en los últimos 6 meses previos al estudio.

Los antecedentes de los sujetos se consignaron en una ficha clínica. Estos incluyeron variables demográficas, hábito tabáquico, y parámetros clínicos periodontales: profundidad de sondaje (PS), nivel de inserción clínica (NIC) y SS usando una sonda periodontal calibrada (UNC-15, Hu-Friedy, Chicago). Se incluyeron además variables radiográficas como nivel óseo radiográfico (NOR) en el caso de sujetos con PC mediante radiografía retroalveolar periapical convencional, calculando la diferencia entre 100% y el porcentaje de pérdida ósea desde el límite amelocementario hasta la cresta ósea alveolar, mientras que en sujetos con PAA se registró el tamaño de la lesión apical (TLA) mediante radiografía retroalveolar periapical convencional, calculando el promedio del diámetro mayor vertical con el horizontal de la lesión.

El protocolo fue claramente explicado por los investigadores a todos los participantes del presente estudio, los cuales firmaron un consentimiento informado aprobado por los Comités de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y de FONDECYT, de acuerdo con los estándares éticos de la declaración de Helsinki (Anexos N°1, N°2 y N°3).

## 2. Obtención de Muestra de FCG y Elución

Las muestras de FCG se obtuvieron mediante tiras de papel (Periopaper®, ProFlow, Amityville, New York, USA), desde los dos sitios con mayor profundidad al sondaje en el caso de los sujetos con PC (dos muestras por sujeto con PC); desde todo el perímetro del crévice (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, distolingual, lingual y mesiolingual), generando un pool de muestra por diente en cada sujeto con PAA (una muestra por sujeto) y desde los dos sitios mesiovestibulares de los primeros molares superiores, en el caso de los sujetos sanos (dos muestras por sujeto sano). Se obtuvieron por tanto, un total de 30 muestras de FCG a partir de 15 sujetos con PC, 30 muestras de FCG a partir de 30 sujetos con PAA y 30 muestras de FCG de 15 sujetos sanos (N=90), en base a un n mínimo calculado correspondiente a 10 casos por grupo, considerando MMP-9 como marcador principal, con una potencia estadística del 90% y un nivel de significancia del 5% (75).

Previa aislación relativa, las tiras de papel se insertaron en el surco gingival durante un periodo estandarizado de 30 segundos, repetido tres veces con intervalos de 1 minuto en los sitios respectivos. Luego, el fluido se eluyó mediante el método descrito en reportes previos (75), en 80 µL de tampón TCL (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> y 0.01% Tritón X-100) con un cóctel inhibidor de proteasas libre de EDTA (Roche Diagnostics GmbH) y se almacenaron a -80°C (Figura 1).

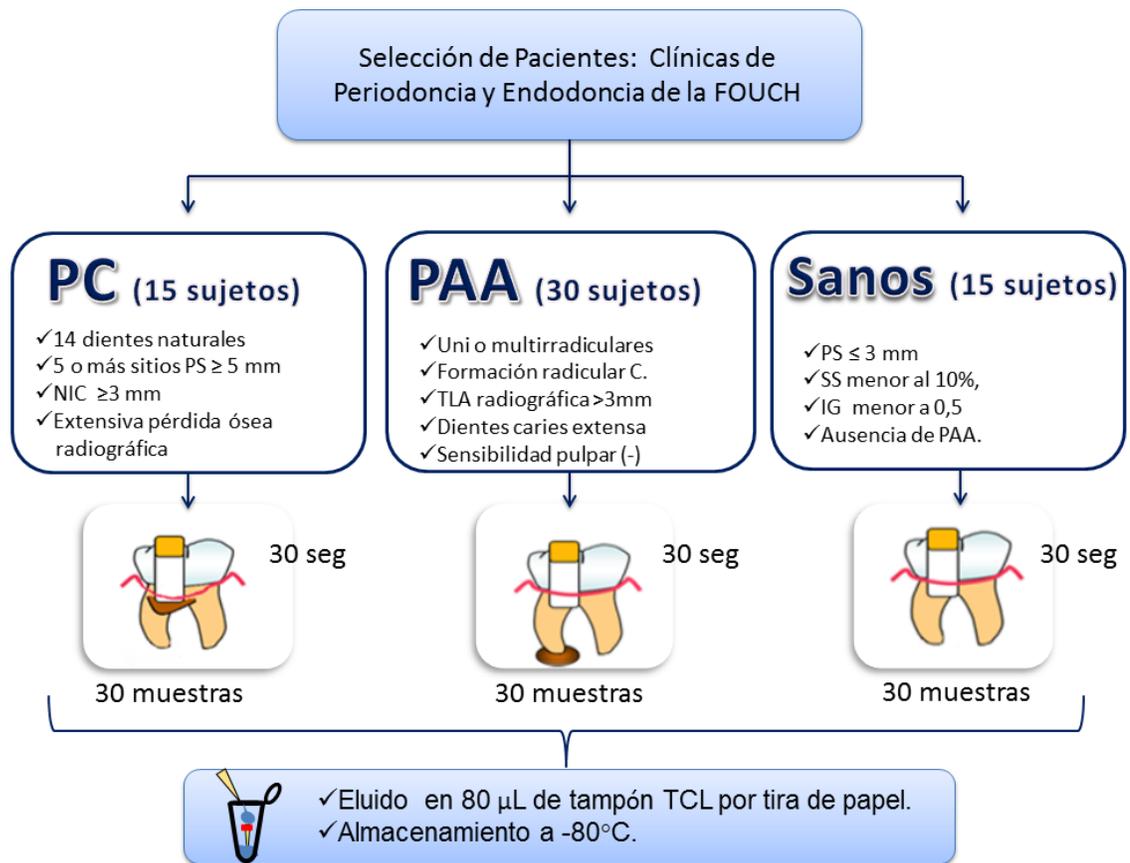


Figura 1. Diagrama de Flujo de secuencia de pasos desde la selección de sujetos con PC: Periodontitis Crónica, PAA: Periodontitis Apical Asintomática y sanos, hasta la obtención de muestras de FCG: Fluido Crevicular Gingival por un periodo estandarizado de 30 segundos, elución en tampón TCL y almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

### **3. Análisis de eluidos en FCG**

#### **3.1 . Determinación de la Concentración de Proteínas Totales**

Se determinó la concentración de proteínas totales en eluidos de FCG mediante el método del ácido biscinconínico, según indicaciones del fabricante (Pierce Biotechnology, Rockford, USA). Las concentraciones se expresaron como mg/mL de eluido obtenidas a partir de una curva estándar usando como estándar albúmina sérica de bovino (BSA). La absorbancia de cada eluido fue determinada mediante el uso de un lector de microplacas *ELx800™*.- BioTek.

#### **3.2 . Detección y Actividad Gelatinolítica de MMP -2 y -9**

Se determinó la frecuencia de detección y actividad gelatinolítica de las proformas y formas activas de MMPs-2 y -9 mediante zimografía en gelatina. Alícuotas de las eluciones de FCG se cargaron en geles SDS-PAGE al 10% con 1mg/mL de gelatina como sustrato; se lavaron dos veces en Tritón X-100 2,5% por 15 minutos e incubaron en un tampón compuesto por 0,5 ml de Tris 1 M pH 7.5 y 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 250 mM durante 17 horas a 37°C. Para visualizar las bandas correspondientes, los geles se tiñeron con Azul brillante de Coomassie R-250 y destiñeron con solución de ácido acético al 10%. La actividad gelatinolítica correspondiente se detectó como bandas

semitransparentes sobre un fondo azul. Se realizó densitometría de las bandas obtenidas mediante un fotodocumentador GEL LOGIC 2200 PRO<sup>TM</sup>, utilizando el Software Carestream Molecular Imaging (©CarestreamHealth Inc. USA). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de densitometría.

### **3.3 Detección y Niveles de MMP-8**

Para la determinación de los niveles de MMP-8 en el FCG de sitios de sujetos con PC, PAA y sanos, se utilizaron dos métodos de análisis: un kit comercial de ELISA (DENTOELISA MMP-8, DENTODIAGNOSTICS, Germany), siguiendo las recomendaciones del fabricante y mediante el método inmunofluorométrico (IFMA). Los niveles de proteína se obtuvieron de una curva estándar y los resultados se expresaron en ng/ml de eluido de FCG.

### **3.4 Productos de Metabolismo Óseo**

La determinación de las frecuencias de detección y cuantificación de los niveles de DKK-1, ON, PN, TRAP y OPG se realizó mediante paneles de detección Multiplex (Millipore, St. Charles, MO, USA.), según indicaciones del fabricante. Los datos se adquirieron mediante una plataforma Luminex (Magpix, Millipore, St Charles, MO) y se

analizaron con el software MILLIPLEX AnalystR (ViageneTech, Carlisle, MA, EE.UU.). Los datos se expresaron en pg/mL de eluido.

#### **4. Análisis Estadístico**

Para las comparaciones de los niveles de los marcadores estudiados se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en base a la distribución de los datos, determinada mediante test de Shapiro-Wilk. Para asociar marcadores de metabolismo óseo con variables clínico-radiográficas cuantitativas y hábito tabáquico se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman y la prueba U de Mann-Whitney, respectivamente. Para las comparaciones de frecuencias entre los grupos de estudio, se utilizó la prueba de Chi-cuadrado. La evaluación de la precisión diagnóstica de los marcadores de interés se realizó mediante la construcción de curvas ROC a través del cálculo del área bajo la curva y la determinación de los puntos de corte óptimos para la estimación de la sensibilidad y especificidad más alta en forma conjunta, utilizando el índice de Youden ( $S + E - 1$ ), así como también los valores predictivos positivos y los valores predictivos negativos. Los datos se analizaron con el paquete estadístico StataV12 para comparar variables cuantitativas y categóricas entre los grupos de estudio, mientras que para la construcción de las curvas ROC se utilizó el paquete estadístico SPSS19. Se consideró significancia estadística si  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### 1. Variables demográficas, clínicas y radiográficas

Los sujetos con PC, PAA y controles sanos presentaron una distribución similar respecto de las características demográficas y del hábito tabáquico (Tabla I).

Tabla I. Variables demográficas de los sujetos con Periodontitis Crónica, Periodontitis Apical Asintomática y Sanos.

Parámetro	PC (n=15)	PAA (n=30)	Sanos (n=15)
Edad media $\pm$ DS (años)	51,1 $\pm$ 13,7	44,9 $\pm$ 13,9	45,3 $\pm$ 13,5
% Mujer	54,8%	55,5%	51,6%
% Fumador	26,66%	23,33%	16,13%

PC: Periodontitis Crónica. PAA: Periodontitis Apical Asintomática. Edad expresada como promedio de años  $\pm$  DS: desviación estándar. Género y fumadores expresados como frecuencia relativa (%).

En relación con las variables clínicas y radiográficas periodontales (PS, NIC, SS y NOR), los sitios seleccionados para la toma de muestra de FCG de sujetos con PC presentaron PS promedio de 6,3  $\pm$  1,9 mm, NIC promedio de 7,5  $\pm$  2,5 mm, sangrado al sondaje de un 100% y NOR promedio de 42,8  $\pm$  22,6%. Respecto a los sujetos con PAA,

presentaron TLA promedio de  $6,2 \pm 2,1$  mm. Finalmente, los sitios para toma de muestra de sujetos sanos y con PAA presentaron PS de  $2,1 \pm 0,4$  y  $2,2 \pm 0,3$  y NIC promedio  $1,7 \pm 0,3$  y  $1,6 \pm 0,2$  mm, respectivamente y ausencia de sangrado al sondaje (Tabla II).

Tabla II. Variables clínicas y radiográficas de los sitios de toma de muestra de FCG de sujetos con Periodontitis Crónica, Periodontitis Apical Asintomática y sanos.

<b>Parámetro</b>	<b>PC</b>	<b>PAA</b>	<b>Sanos</b>
<b>PS media <math>\pm</math> 2,1 DS (mm)</b>	$6,3 \pm 1,9$	$2,1 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,3$
<b>NIC media <math>\pm</math> DS (mm)</b>	$7,5 \pm 2,5$	$1,7 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,2$
<b>SS (%)</b>	100	0	0
<b>NOR media <math>\pm</math> DS (<math>\% \bar{X}</math>)</b>	$42,8 \pm 22,6$	-----	-----
<b>TLA media <math>\pm</math> DS (mm)</b>	-----	$6,2 \pm 2,1$	-----

PC: Periodontitis Crónica. PAA: Periodontitis Apical Asintomática.  $\pm$  DS: desviación estándar. PS: profundidad al sondaje expresada en mm. NIC: nivel de inserción clínica expresado en mm. SS: sangrado al sondaje expresado en porcentaje. NOR: Nivel Óseo Radiográfico, expresado en porcentaje promedio. TLA: Tamaño Lesión Apical, expresado en mm.

## 2. Marcadores de metabolismo óseo.

### 2.1 Concentración de proteínas totales

Se observó una concentración de proteínas totales significativamente mayor en sitios de sujetos con PC en comparación con PAA y sanos ( $p < 0,01$ ), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre PAA y sanos ( $p > 0,05$ ) (Figura 2).

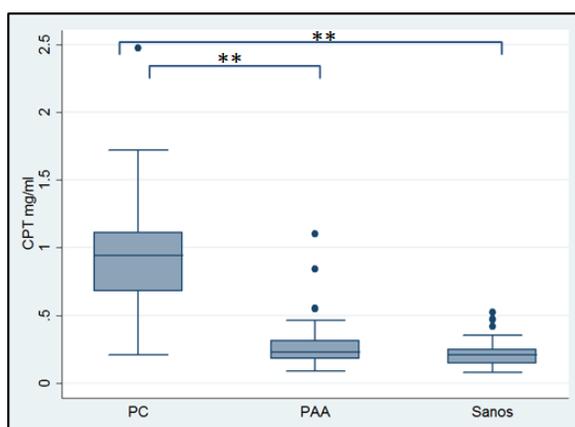


Figura 2. Concentración de Proteínas Totales expresados en mg/ml de eluido de FCG en sujetos con Periodontitis Crónica (PC), Periodontitis Apical Asintomática (PAA) y Sanos. \*\* $p < 0,01$  test Kruskal-Wallis.

## 2.2. Detección, actividad gelatinolítica de MMPs -2 -9 y niveles de MMP-8

Se identificaron la proforma y forma activa de MMP-9; y en forma infrecuente, la proforma de MMP-2, mientras que su forma activa no se identificó en las muestras analizadas mediante zimografía (Figura 3). MMP-8 y proMMP-9 se identificaron en todas las muestras. Las frecuencias de detección de ProMMP-2 variaron significativamente entre los grupos de estudio ( $p < 0.05$ ). Los sitios con PC presentaron las frecuencias de detección más altas (90,32%), seguidos por PAA (67,64%) y controles sanos (29,03%), mientras que MMP-9 activa se identificó en todas las muestras de PC y PAA, y en 90% de los controles (Tabla III).

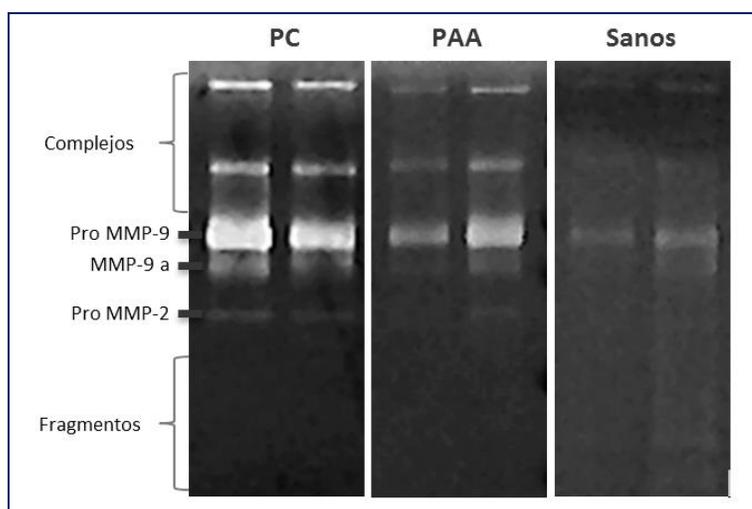


Figura 3. Identificación de formas enzimáticas de MMP-2 y -9 mediante zimografía en FCG de sujetos con Periodontitis Crónica (PC), Periodontitis Apical Asintomática (PAA) y sanos. ProMMP-9: Proforma de MMP-9. MMP-9a: forma activa de MMP-9. ProMMP-2: Proforma de MMP-2.

Tabla III. Frecuencias de detección de MMP-2, 9 y 8 en FCG de sujetos con Periodontitis Crónica, Periodontitis Apical Asintomática y Sanos.

<b>Forma enzimática</b>	<b>PC</b>	<b>PAA</b>	<b>Sanos</b>	<b>P</b>
<b>ProMMP-2</b>	90,32%*	67,64%*	29,03%	0,0001
<b>ProMMP-9</b>	100%	100%	100%	-----
<b>MMP-9a</b>	100%	100%	90%	>0,05
<b>MMP-8 (ELISA)</b>	100%	100%	100%	-----
<b>MMP-8 (IFMA)</b>	100%	100%	100%	-----

PC: Periodontitis Crónica. PAA: Periodontitis Apical Asintomática. ProMMP-2: Proforma de MMP-2 ProMMP-9: Proforma de MMP-9. MMP-9a: Forma activa de MMP-9. MMP-8 (ELISA): MMP-8 medido con ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima. MMP-8 (IFMA): MMP-8 medido con ensayo inmunofluorométrico. \* $p < 0,001$  test  $\chi^2$ .

Respecto de los niveles y actividad de MMPs, se observó mayor actividad de proMMP-2 en los sitios de sujetos con PC en comparación con PAA y sanos ( $p < 0.01$ ), mientras que no se observaron diferencias entre los sujetos con PAA y sanos ( $p > 0.05$ ) (Figura 4 A). En relación con la actividad de proMMP-9, forma activa de MMP-9, activación de MMP-9 y niveles de MMP-8 (ELISA e IFMA), se observaron diferencias significativas entre los grupos. Estas fueron mayores en los sitios de los sujetos con PC en comparación con PAA y sanos. A su vez, los sitios con PAA presentaron niveles de proMMP-9, MMP-9a, activación de MMP-9 y niveles de MMP-8 (ELISA e IFMA) significativamente mayores que los controles sanos ( $p < 0.05$ ) (Figuras 4 B, C, D y E).

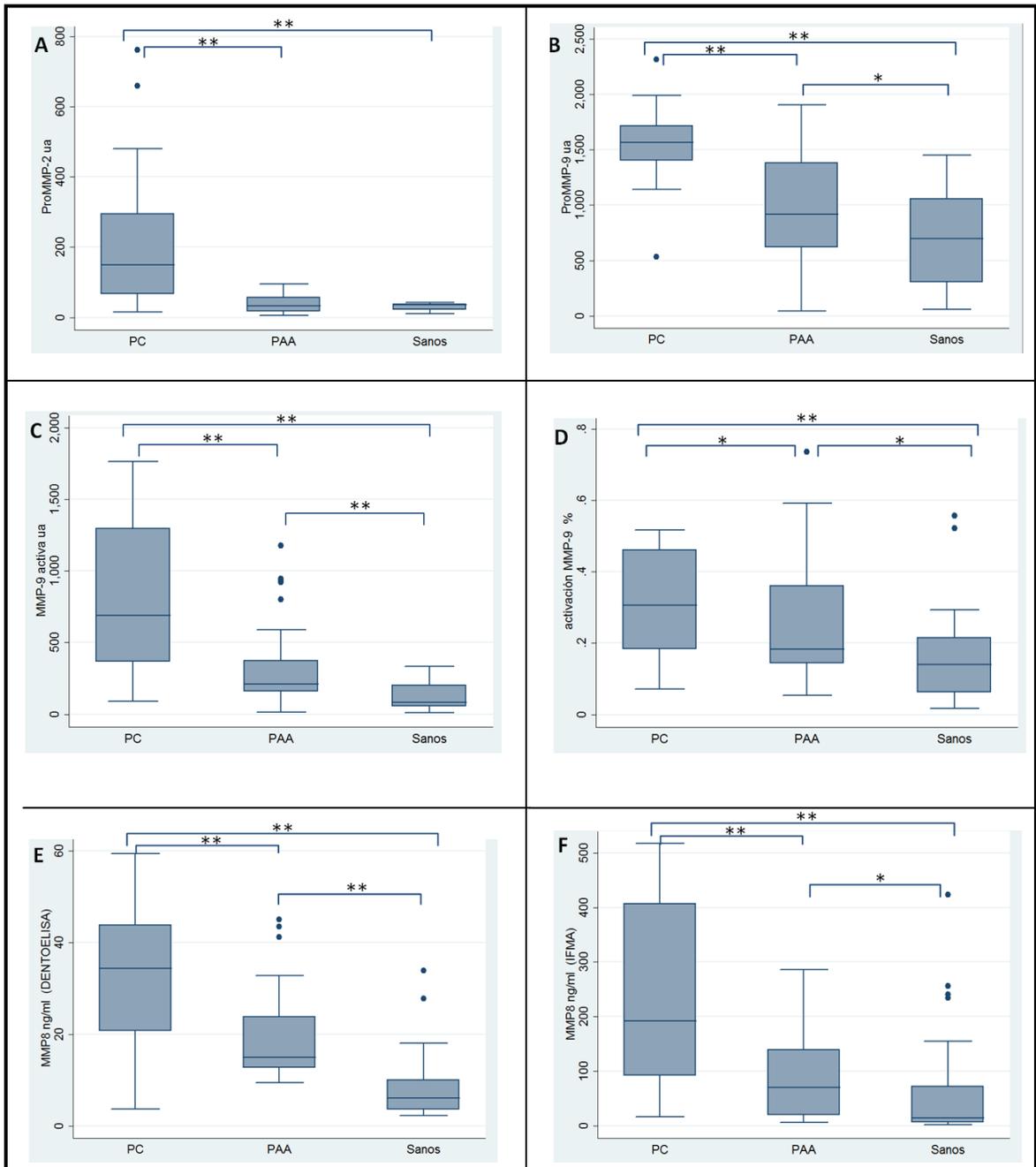


Figura 4. Actividad gelatinolítica de MMP-2, 9 y niveles de MMP-8 en FCG de sujetos con Periodontitis Crónica (PC), Periodontitis Apical Asintomática (PAA) y Sanos. A)

Niveles de ProMMP-2. B) Niveles de ProMMP-9. C) Niveles de MMP-9 activa. ua: unidades arbitrarias (píxeles). D) Activación de MMP-9: Relación entre formas activas v/s proforma + formas activas expresados en porcentaje. E) Niveles de MMP-8 medido con ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). F) Niveles de MMP-8 medidos con ensayo inmunofluorométrico (IFMA). Expresados en ng/ml de eluido de FCG. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  test Kruskal-Wallis.

### **2.3. Detección y niveles de DKK-1, ON, PTN, TRAP y OPG**

Se determinaron las frecuencias de detección y niveles de DKK-1, ON, PTN, TRAP y OPG mediante paneles de cuantificación Multiplex. Las frecuencias de detección para ON fueron significativamente mayores en sitios con PAA en comparación con sitios con PC y sanos. En relación con PTN, las frecuencias de detección fueron significativamente mayores en sitios de sujetos con PC en comparación con PAA y sanos. Por su parte, TRAP se detectó en todas las muestras analizadas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de detección para DKK-1 y OPG entre los grupos de estudio ( $p < 0,05$ ) (Tabla IV).

Tabla IV. Frecuencias de detección de DKK-1, ON, PTN, TRAP y OPG en FCG de sujetos con Periodontitis Crónica, Periodontitis Apical Asintomática y Sanos.

<b>Marcador</b>	<b>PC</b>	<b>PAA</b>	<b>Sanos</b>	<b>p</b>
<b>DKK-1</b>	66,7%	61,1%	52,6%	>0,05
<b>ON</b>	50%	72,2%*	47%	<b>0,029</b>
<b>PTN</b>	72,2%*	22,2%	26,3%	<b>0,003</b>
<b>TRAP</b>	100%	100%	100%	-----
<b>OPG</b>	94,4%	88,2%	87,5%	>0,05

Frecuencias de detección expresados en porcentaje. PC: Periodontitis Crónica. PAA: Periodontitis Apical Asintomática. DKK-1: Dickkopf-1. ON: Osteonectina. PTN: Periostina. TRAP: Fosfatasa ácida resistente a tartrato. OPG: Osteoprotegerina \* $p < 0,05$  test  $\chi^2$

Se observaron niveles significativamente mayores de TRAP y OPG en sitios de sujetos con PC en comparación con PAA y sanos ( $p < 0,05$ ), sin embargo no se observaron diferencias entre sitios de sujetos con PAA y sanos ( $p > 0,05$ ). En relación con los niveles de DKK-1, ON y PTN, no se observaron diferencias entre los grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 5).

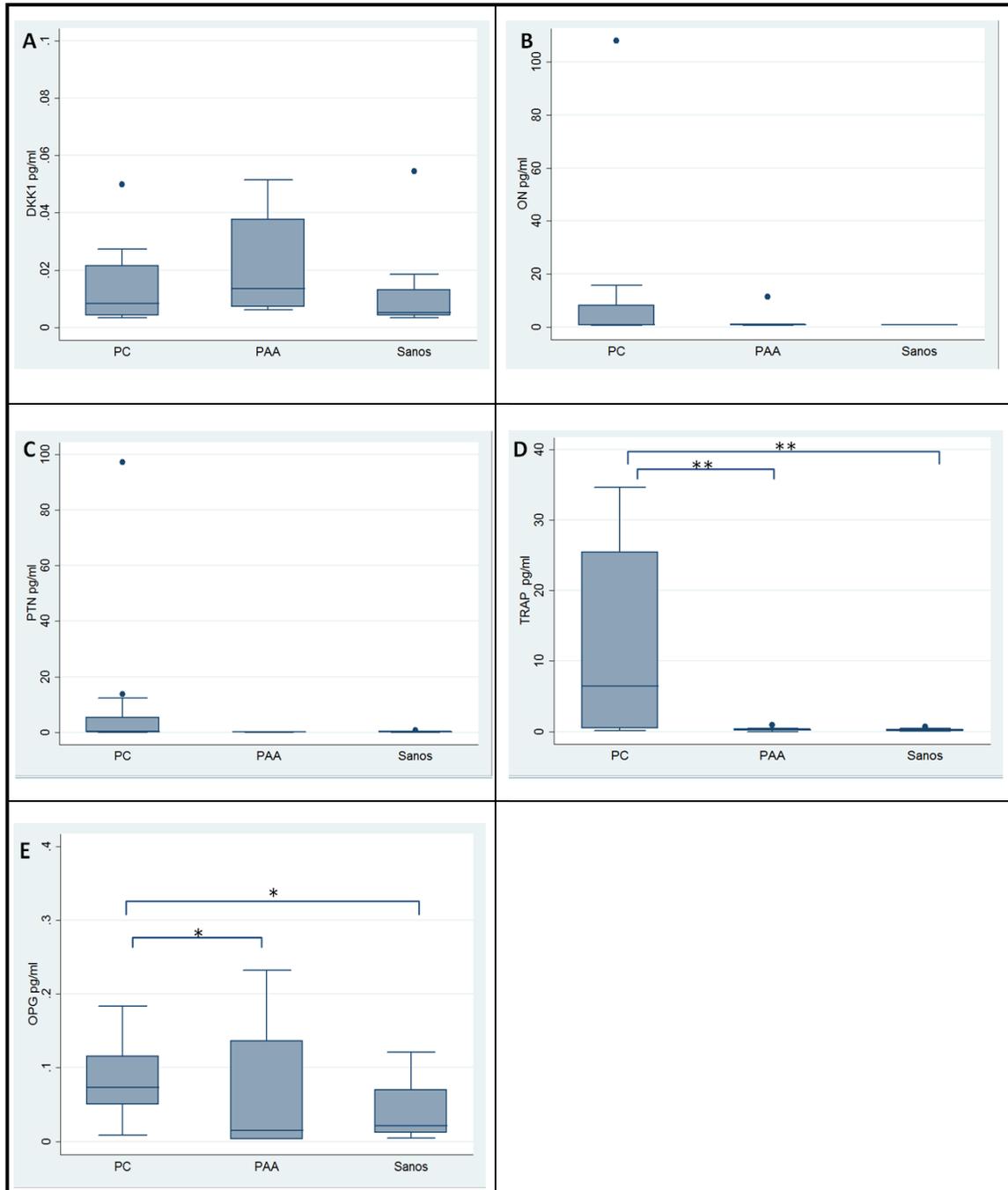


Figura 5. Niveles de marcadores óseos directos en FCG de sujetos con Periodontitis Crónica (PC), Periodontitis Apical Asintomática (PAA) y Sanos. A) DKK-1: Dickoff-1.

B) ON: Osteonectina. C) PTN: Periostina. D) TRAP: Fosfatasa ácida resistente a tartrato. E) OPG: Osteoprotegerina, expresados en pg/ml de eluido de FCG. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  test Kruskal-Wallis.

### **3. Asociación de marcadores con variables clínico-radiográficas y hábito tabáquico.**

#### **3.1. Asociación de marcadores con variables clínico-radiográficas y hábito tabáquico en sujetos con Periodontitis Crónica**

Al asociar los niveles moleculares de los marcadores de estudio con variables clínico-radiográficas correspondientes a los sitios analizados de sujetos con PC se observó una correlación directa estadísticamente significativa entre los niveles de Pro-MMP-2, MMP-9 activa, porcentaje de activación de MMP-9 y TRAP con PS ( $\rho = 0,72$ ,  $\rho = 0,66$ ,  $\rho = 0,67$  y  $\rho = 0,69$  respectivamente,  $p < 0,001$ ) y NIC ( $\rho = 0,59$ ,  $\rho = 0,56$ ,  $\rho = 0,52$  y  $\rho = 0,66$  respectivamente,  $p < 0,01$ ). De igual forma, se observó una correlación directa estadísticamente significativa entre los niveles de MMP-8 (ELISA e IFMA) con PS ( $\rho = 0,49$  y  $\rho = 0,58$  respectivamente,  $p \leq 0,01$ ), así como también una correlación directa estadísticamente significativa entre niveles de ON y NIC ( $\rho = 0,89$ ,  $p = 0,04$ ). Por otra parte, se observó una correlación indirecta estadísticamente significativa entre niveles de TRAP y NOR ( $\rho = -0,51$ ,  $p = 0,04$ ) (Tabla V).

Tabla V. Niveles de marcadores de metabolismo óseo asociados a variables clínico-radiográficas de sujetos con Periodontitis Crónica.

	CPT	ProMMP2	ProMMP9	MMP9a	ActMMP9	MMP8e	MMP8i	DKK-1	ON	PTN	TRAP	OPG
<b>PS</b>	rho=0,3 p=0,1	rho=0,72 <b>**p=0,00</b>	rho=-0,08 p=0,683	rho=0,66 <b>**p=0,00</b>	rho=0,67 <b>**p=0,00</b>	rho=0,49 <b>**p=0,01</b>	rho=0,58 <b>**p=0,00</b>	rho=0,0 p=0,811	rho=0,7 p=0,1	rho=-0,4 p=0,12	rho=0,69 <b>**p=0,00</b>	rho=0,12 p=0,663
<b>NIC</b>	rho=0,1 p=0,47	rho=0,59 <b>**p=0,00</b>	rho=0,14 p=0,496	rho=0,56 <b>**p=0,00</b>	rho=0,52 <b>**p=0,00</b>	rho=0,2 p=0,184	rho=0,3 p=0,055	rho=0,1 p=0,656	rho=0,8 <b>*p=0,04</b>	rho=-0,5 p=0,05	rho=0,6 <b>**p=0,00</b>	rho=0,2 p=0,372
<b>NOR</b>	rho=-0,2 p=0,1	rho=-0,02 p=0,22	rho=-0,27 p=0,188	rho=-0,1 p=0,615	rho=-0,11 p=0,609	rho=0,0 p=0,702	rho=0,0 p=0,805	rho=0,0 p=0,899	rho=-0,7 p=0,1	rho=0,1 p=0,68	rho=-0,5 <b>*p=0,04</b>	rho=0,0 p=0,789

PS: Profundidad al sondaje de sitios con Periodontitis Crónica. NIC: Nivel de inserción clínica de sitios con Periodontitis Crónica. NOR: Nivel óseo radiográfico de sitios con Periodontitis Crónica. CPT: Concentración de proteínas totales. ProMMP-2: Proforma de MMP-2. ProMMP-9: Proforma de MMP-9. MMP-9 a: Forma activa de MMP-9. Activación MMP-9: Relación entre formas activas v/s proforma + formas activas. MMP-8 (IFMA): MMP-8 medida con ensayo inmunofluorométrico. MMP-8 (ELISA): MMP-8 medido con ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima. DKK-1: Dickkopf-1. ON: osteonectina. PTN: Periostina. TRAP: Fosfatasa ácida resistente a tartrato. OPG: Osteoprotegerina. rho: Coeficiente de correlación de Spearman. **\*\*p**≤0,01, **\*p**<0,05.

Al estratificar las profundidades al sondaje en dos categorías ( $\leq 6$  mm y  $> 6$  mm), se observaron mayores niveles de ProMMP-2, MMP-9 activa, porcentaje de activación de MMP-9, MMP-8 (IFMA) y TRAP en los sitios con profundidades al sondaje mayores a 6 mm en comparación a los sitios con profundidades al sondaje menores o iguales a 6 mm ( $p < 0,05$ ) (Tabla VI).

Tabla VI. Niveles de marcadores de metabolismo óseo asociados a estratificación de profundidades al sondaje en sujetos con Periodontitis Crónica.

	<b>PS ≤ 6 mm n=16</b> Mediana (RIQ)	<b>PS &gt; 6 mm n=14</b> Mediana (RIQ)	<b>p</b>
<b>CPT (mg/ml)</b>	0,9429 (0,75)	1,0806 (0,31)	0,454
<b>ProMMP-2 (ua)</b>	80,12 (156,81)	311,60 (216,39)	<b>**0,003</b>
<b>ProMMP-9 (ua)</b>	1632,48 (444,43)	1555,52 (205,41)	0,657
<b>MMP-9 a (ua)</b>	595,38 (849,94)	1264,21 (441,92)	<b>*0,020</b>
<b>Activación MMP-9 (%)</b>	0,288 (0,26)	0,46 (0,09)	<b>*0,017</b>
<b>MMP-8 (IFMA) (ng/ml)</b>	151.296 (329,54)	363,62 (382,02)	<b>*0,040</b>
<b>MMP-8 (ELISA) (ng/ml)</b>	33,39 (32,58)	35,68 (6,55)	0,245
<b>DKK-1(pg/ml)</b>	0,0042 (0,01)	0,0075 (0,02)	0,640
<b>ON (pg/ml)</b>	0,730 (80,7)	0,55 (0,55)	0,468
<b>PTN (pg/ml)</b>	0,566 (1,22)	0,305(0,09)	0,239
<b>TRAP (pg/ml)</b>	0,650 (1,28)	2,147 (2,04)	<b>*0,028</b>
<b>OPG (pg/ml)</b>	0,073 (0,11)	0,104 (0,10)	0,524

PS: Profundidad al sondaje. RIQ: Rango intercuartílico. CPT: Concentración de proteínas totales expresado en mg/ml. ProMMP-2: proforma de MMP-2. ProMMP-9: Proforma de MMP-9. MMP-9 a: Forma activa de MMP-9. ua: unidades arbitrarias (pixeles). Activación MMP-9: relación entre formas activas v/s proforma + formas activas expresado en porcentaje. MMP-8 (IFMA): MMP-8 medido con ensayo inmunofluorométrico. MMP-8 (ELISA): MMP-8 medido con ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima expresados en ng/ml. DKK-1: Dickkopf-1. ON: Osteonectina. PTN: Periostina. TRAP: Fosfatasa ácida resistente a tartrato. OPG: Osteoprotegerina expresados en pg/ml. \*p<0,05 \*\*p<0,01 test Mann-Whitney.

Respecto al hábito tabáquico en sujetos con periodontitis crónica, no se observaron diferencias significativas entre fumadores y no fumadores para los marcadores estudiados ( $p>0,05$ ) (Tabla VII).

Tabla VII. Niveles de marcadores de metabolismo óseo asociados a hábito tabáquico en sitios de sujetos con Periodontitis Crónica.

	<b>No Fumador n=22</b> Mediana (RIQ)	<b>Fumador n=8</b> Mediana (RIQ)	<b>p</b>
<b>CPT (mg/ml)</b>	1,02 (0,67)	0,69 (0,39)	0,07
<b>ProMMP-2 (ua)</b>	171,71 (280,58)	93,740 (134,52)	0,62
<b>ProMMP-9 (ua)</b>	1481,85 (276,67)	1704,78 (207,55)	0,06
<b>MMP-9 a (ua)</b>	838,80 (976,43)	691,02 (866,73)	0,90
<b>Activación MMP-9 (%)</b>	0,387 (0,28)	0,288 (0,25)	0,71
<b>MMP-8 (IFMA) (ng/ml)</b>	223,77 (298,16)	151,29 (397,86)	0,71
<b>MMP-8 (ELISA) (ng/ml)</b>	34,765 (16,44)	25,400 (41,83)	0,48
<b>DKK-1 (pg/ml)</b>	0,003 (0,01)	0,006 (0,01)	0,44
<b>ON (pg/ml)</b>	0,86 (5,41)	0,55 (0,55)	0,80
<b>PTN (pg/ml)</b>	0,075 (1,33)	0,119 (0,29)	1,00
<b>TRAP (pg/ml)</b>	1,04 (1,76)	1,08 (2,91)	0,96
<b>OPG (pg/ml)</b>	0,07 (0,10)	0,09 (0,25)	0,32

RIQ: rango intercuartílico. CPT: concentración de proteínas totales expresado en mg/ml. ProMMP-2: proforma de MMP-2. ProMMP-9: proforma de MMP-9. MMP-9 a: forma activa de MMP-9. ua: unidades arbitrarias (pixeles). Activación MMP-9: relación entre formas activas v/s

proforma + formas activas expresado en porcentaje. MMP-8 (IFMA): MMP-8 medido con ensayo inmunofluorometrico. MMP-8 (ELISA): MMP-8 medido con ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima expresados en ng/ml. DKK-1: Dickkopf-1. ON: Osteonectina. PTN: Periostina. TRAP: Fosfatasa ácida resistente a tartrato. OPG: Osteoprotegerina expresados en pg/ml. p, test Mann-Whitney.

### 3.2. Asociación de marcadores con variables radiográficas y hábito tabáquico en sujetos con Periodontitis Apical Asintomática

No se observó correlación estadísticamente significativa entre los niveles moleculares de los marcadores de estudio y TLA de dientes afectados con periodontitis apical asintomática (Tabla VIII).

Tabla VIII. Niveles de marcadores de metabolismo óseo asociados a variables radiográficas de sujetos con Periodontitis Apical Asintomática.

	CPT	ProMMP2	ProMMP9	MMP9a	ActMMP9	MMP8e	MMP8i	DKK-1	ON	PTN	TRAP	OPG
TLA	rho=0,1 p=0,59	rho=0,06 p=0,852	rho=-0,16 p=0,464	rho=0,1 p=0,622	rho=0,10 p=0,640	rho=-0,3 p=0,056	rho=-0,01 p=0,937	rho=-0,2 p=0,40	rho=0,11 p=0,66	rho=-0,2 p=0,32	rho=-0,1 p=0,6	rho=-0,1 p=0,444

TLA: tamaño de lesión apical de dientes de sujetos con Periodontitis Apical Asintomática. CPT: Concentración de proteínas totales. ProMMP-2: Proforma de MMP-2. ProMMP-9: Proforma de MMP-9. MMP-9 a: forma activa de MMP-9. Activación MMP-9: Relación entre formas activas v/s proforma + formas activas. MMP-8 (IFMA): MMP-8 medido con ensayo inmunofluorometrico. MMP-8 (ELISA): MMP-8 medido con ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima. DKK-1: Dickkopf-1. ON: Osteonectina. PTN: Periostina. TRAP: Fosfatasa ácida resistente a tartrato. OPG: Osteoprotegerina. rho: Coeficiente de correlación de Spearman.

Respecto al hábito tabáquico en sujetos con periodontitis apical asintomática, no se observaron diferencias significativas entre fumadores y no fumadores en los niveles de los marcadores estudiados ( $p>0,05$ ) (Tabla IX).

Tabla IX. Niveles de marcadores de metabolismo óseo asociados a hábito tabáquico en sujetos con Periodontitis Apical Asintomática.

	<b>No Fumador</b> n=23 Mediana (RIQ)	<b>Fumador</b> n=7 Mediana (RIQ)	<b>p</b>
<b>CPT (mg/ml)</b>	0,19 (0,17)	0,23 (0,06)	0,35
<b>ProMMP-2 (ua)</b>	15,30 (53,30)	16,37 (48,67)	1,00
<b>ProMMP-9 (ua)</b>	888,68 (769,06)	663,50 (580,06)	0,58
<b>MMP-9 a (ua)</b>	218,43 (211,32)	166,03 (354,29)	0,35
<b>Activación MMP-9 (%)</b>	0,18 (0,1)	0,18 (0,2)	0,75
<b>MMP-8 (IFMA) (ng/ml)</b>	108,85 (198,03)	84,47 (142,89)	0,89
<b>MMP-8 (ELISA) (ng/ml)</b>	14,51 (12,75)	17,02 (8,79)	0,77
<b>DKK-1 (pg/ml)</b>	0,008 (0,02)	0,002 (0,01)	0,27
<b>ON (pg/ml)</b>	0,73 (0,09)	0,86 (0,39)	0,21
<b>PTN (pg/ml)</b>	0,07 (1,30)	0,06 (0,10)	0,23
<b>TRAP (pg/ml)</b>	0,18 (0,28)	0,28 (0,25)	0,14
<b>OPG (pg/ml)</b>	0,011 (0,10)	0,004 (0,07)	0,94

RIQ: rango intercuartílico. CPT: concentración de proteínas totales expresado en mg/ml. ProMMP-2: proforma de MMP-2. ProMMP-9: proforma de MMP-9. MMP-9 a: forma activa de

MMP-9. ua: unidades arbitrarias (pixeles). Activación MMP-9: relación entre formas activas v/s proforma + formas activas expresado en porcentaje. MMP-8 (IFMA): MMP-8 medido con ensayo inmunofluorométrico. MMP-8 (ELISA): MMP-8 medido con ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima expresados en ng/ml. DKK-1: Dickkopf-1. ON: Osteonectina. PTN: Periostina. TRAP: Fosfatasa ácida resistente a tartrato. OPG: Osteoprotegerina expresados en pg/ml. p, test Mann-Whitney.

#### **4. Análisis de precisión diagnóstica.**

##### **4.1. Análisis de precisión diagnóstica en Periodontitis Crónica**

El análisis de precisión diagnóstica en PC mediante curvas ROC (Figura 6) demostró áreas bajo la curva (ABC) estadísticamente significativas (respecto al área bajo la diagonal de referencia) en CPT, ProMMP-2, ProMMP-9, MMP-9 activa, porcentaje de activación de MMP-9, niveles de MMP-8 (ELISA e IFMA), PTN, TRAP y OPG ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no se observó significancia estadística en ABC para DKK-1 y ON ( $p > 0,05$ ; Tabla X).

Las curvas ROC que presentaron muy alta precisión diagnóstica para sitios con PC, definida como  $ABC > 0,9$ , correspondieron a CPT, proMMP-2, proMMP-9, MMP-9 activa, MMP-8 (ELISA), y TRAP, con ABC de 0,965, 0,911, 0,94, 0,954, 0,939 y 0,947, respectivamente. A su vez los marcadores activación de MMP-9, MMP-8 (IFMA), PTN

y OPG presentaron un nivel aceptable de rendimiento diagnóstico con  $ABC \geq 0,75$  (Tabla X).

A continuación se obtuvieron los puntos de corte óptimos para cada marcado utilizando el índice de Youden. El mejor rendimiento se observó para CPT con un punto de corte de 0,55 mg/ml, que presentó una sensibilidad de 87,1% y una especificidad de 100%, con valores predictivos positivo y negativo de 100% y 88,57% respectivamente; seguido por TRAP, que con un punto de corte de 0,381 pg/ml, presentó una sensibilidad de 88,89% y una especificidad de 89,47%, con valores predictivos positivo y negativo de 88,89% y 89,47% respectivamente; y en tercer lugar observamos el marcador MMP-9 activa con un punto de corte de 284,89 ua., presentó una sensibilidad de 90,32% y una especificidad de 87,10%, con valores predictivos positivo y negativo de 87,5% y 90,0%, respectivamente (Tabla X).

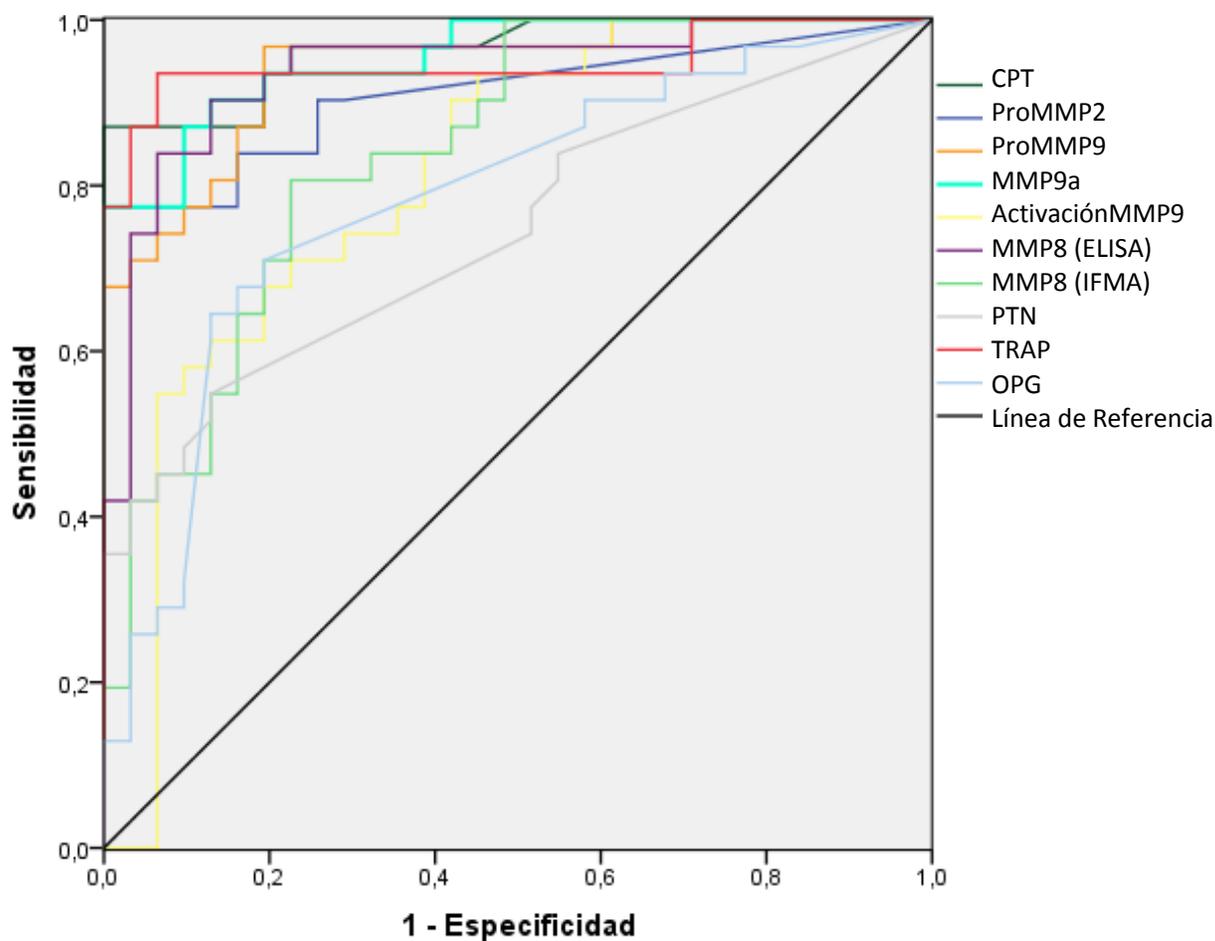


Figura 6. **Curvas ROC para Diagnóstico de Periodontitis Crónica**

CPT: Concentración de proteínas totales. ProMMP-2: Proforma de MMP-2. ProMMP-9: Proforma de MMP-9. MMP-9 a: Forma activa de MMP-9. Activación MMP-9: Relación entre formas activas v/s proforma + formas activas. MMP-8 (ELISA): MMP-8 medido con ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima. MMP-8 (IFMA): MMP-8 medida con ensayo inmunofluorométrico. DKK-1: Dickkopf-1. ON: osteonectina. PTN: Periostina. TRAP: Fosfatasa ácida resistente a tartrato. OPG: Osteoprotegerina.

Tabla X. Precisión de marcadores biológicos para diagnóstico de Periodontitis Crónica

Marcador	Precisión (ABC, IC)	p	Corte	S	E	VPP	VPN
CPT	0,965 (0,924 - 1,000)	0,000*	0,55 mg/ml	87,10%	100%	100%	88,57%
ProMMP2	0,911 (0,833 - 0,988)	0,000*	44,59 ua	77,42%	100%	100%	81,58%
ProMMP9	0,941 (0,886 - 0,996)	0,000*	1115,91 ua	96,77%	80,65%	83,33%	96,15%
MMP9a	0,954 (0,909 - 1,000)	0,000*	284,89 ua	90,32%	87,10%	87,50%	90,00%
%aMMP9	0,812 (0,701 - 0,922)	0,000*	21,25%	70,97%	77,42%	75,86%	72,73%
MMP8ELISA	0,939 (0,877 - 1,000)	0,000*	15,01ng/ml	87,50%	89,66%	87,50%	89,66%
MMP8IFMA	0,843 (0,747 - 0,939)	0,000*	75,01ng/ml	80,65%	77,42%	78,13%	80,00%
DKK1	0,618 (0,435 - 0,802)	0,154	—	—	—	—	—
ON	0,504 (0,314 - 0,695)	0,676	—	—	—	—	—
PTN	0,750 (0,623 - 0,869)	0,001*	0,110pg/ml	72,22%	73,68%	72,22%	73,68%
TRAP	0,947 (0,883 - 1,000)	0,000*	0,381pg/ml	88,89%	89,47%	88,89%	89,47%
OPG	0,785 (0,668 - 0,901)	0,000*	0,044pg/ml	72,22%	77,27%	72,22%	77,27%

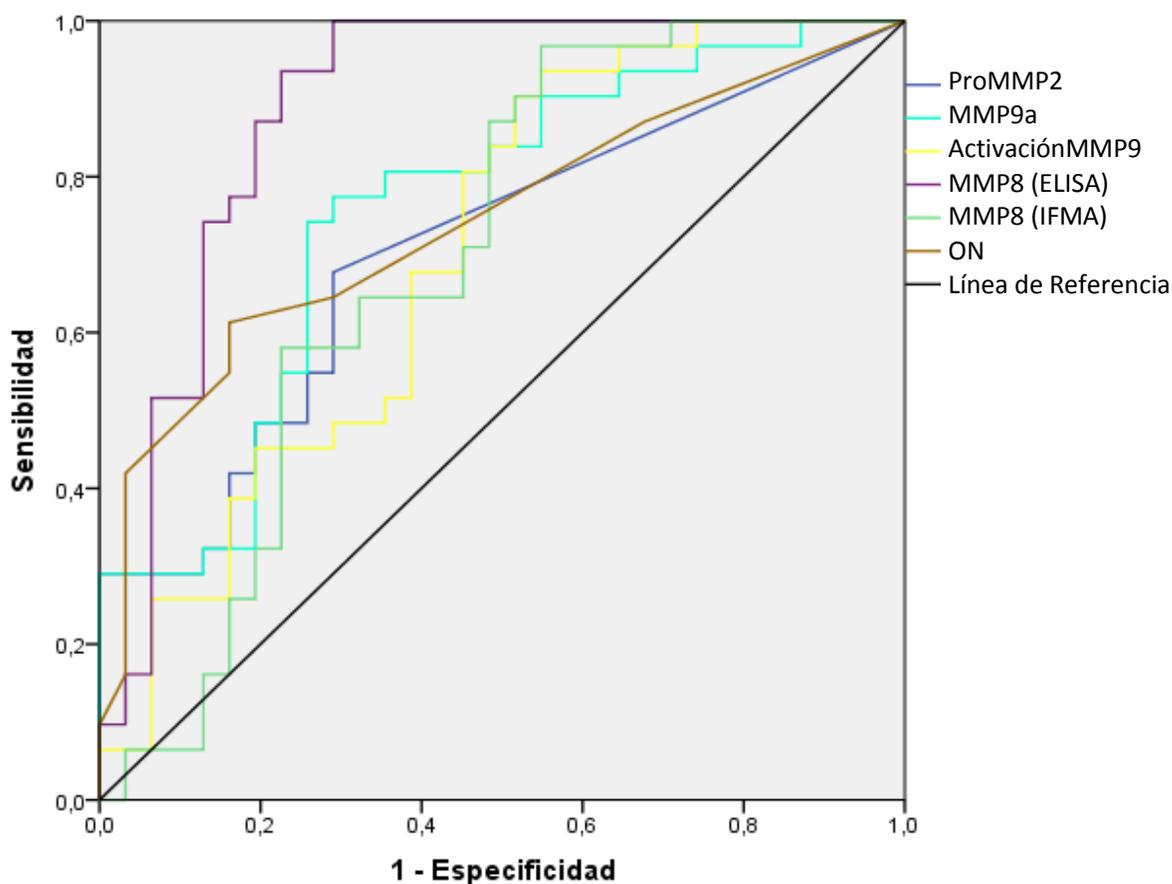
ABC: Área Bajo la Curva. IC: Intervalo de Confianza al 95%. \*p<0,05. S: Sensibilidad. E: Especificidad. VPP: Valor Predictivo Positivo. VPN: Valor Predictivo Negativo. CPT: Concentración de proteínas totales. ProMMP-2: Proforma de MMP-2. ProMMP-9: Proforma de MMP-9. MMP-9 a: Forma activa de MMP-9. Activación MMP-9: Relación entre formas activas v/s proforma + formas activas. MMP-8ELISA: MMP-8 medido con ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima. MMP-8 IFMA: MMP-8 medida con ensayo inmunofluorométrico. DKK-1: Dickkopf-1. ON: osteonectina. PTN: Periostina. TRAP: Fosfatasa ácida resistente a tartrato. OPG: Osteoprotegerina.

#### **4.2. Análisis de precisión diagnóstica para el diagnóstico de Periodontitis Apical Asintomática.**

En relación con la construcción de curvas ROC para el diagnóstico de PAA (Figura 7), se observaron ABC estadísticamente significativas (respecto al área bajo la diagonal de referencia) para ProMMP-2, MMP-9 activa, activación de MMP-9, MMP-8 (ELISA), MMP-8 (IFMA), y ON ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no se observó significancia estadística en ABC para CPT, proMMP-9, DKK-1, PTN, TRAP y OPG ( $p > 0,05$ ) (Tabla XI).

Se obtuvo un alto rendimiento en la construcción de la curva ROC para el marcador MMP-8 (ELISA) para el diagnóstico de sitios de dientes con PAA v/s Sanos con un ABC de 0,869; Utilizando el índice de Youden más alto, se determinó un punto de corte óptimo de 10,38 ng/ml, con el cual se obtuvo una sensibilidad de 92,00% y una especificidad de 76,67%, con valores predictivos positivo y negativo de 76,6% y 91,67%, respectivamente (Tabla XI). A su vez, se obtuvo un rendimiento aceptable en la construcción de las curvas ROC del marcador MMP-9 activa para el diagnóstico de sitios de dientes con PAA v/s sanos con un ABC de 0,755. Para este marcador, se estableció un punto de corte de 1557,44 ua. de densitometría, con el cual se obtuvo una sensibilidad de 77,42% y una especificidad de 70,97%, con valores predictivos positivo y negativo de 72,73% y 75,86%, respectivamente (Tabla XI). Finalmente, se obtuvo un rendimiento regular en la construcción de curvas ROC de los marcadores ProMMP-2,

activación de MMP-9, MMP-8 (IFMA) y ON para el diagnóstico de sitios de dientes con PAA v/s Sanos con áreas bajo la curva de 0,706, 0,701, 0,684, y 0,744, respectivamente.



**Figura 7. Curvas ROC para Diagnóstico de Periodontitis Apical Asintomática**

ProMMP-2: Proforma de MMP-2. MMP-9 a: Forma activa de MMP-9. Activación MMP-9: Relación entre formas activas v/s proforma + formas activas. MMP-8 (ELISA): MMP-8 medido con ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima. MMP-8 (IFMA): MMP-8 medida con ensayo inmunofluorométrico. ON: osteonectina.

Tabla XI. Precisión de marcadores biológicos para diagnóstico de Periodontitis Apical Asintomática.

Marcador	Precisión (ABC, IC)	p	Corte	S	E	VPP	VPN
CPT	0,620 (0,480 – 0,761)	0,104	—	—	—	—	—
ProMMP2	0,706 (0,575 – 0,836)	0,005*	3,005 ua	67,74%	70,97%	70,00%	68,75%
ProMMP9	0,627 (0,488 – 0,767)	0,085	—	—	—	—	—
MMP9a	0,755 (0,635 – 0,876)	0,001*	1557,44 ua	77,42%	70,97%	72,73%	75,86%
%aMMP9	0,701 (0,570 – 0,832)	0,006*	16,2%	67,74%	61,29%	63,64%	65,52%
MMP8ELISA	0,869 (0,769 – 0,969)	0,000*	10,38ng/ml	92,00%	75,86%	76,67%	91,67%
MMP8IFMA	0,681 (0,542 – 0,821)	0,019*	14,89ng/ml	84,62%	51,61%	59,46%	80,00%
DKK1	0,602 (0,414 – 0,790)	0,288	—	—	—	—	—
ON	0,744 (0,582 – 0,907)	0,011*	0,63pg/ml	72,22%	73,68%	72,22%	73,68%
TRAP	0,632 (0,447 – 0,816)	0,171	—	—	—	—	—
OPG	0,538 (0,347 – 0,729)	0,693	—	—	—	—	—
PTN	0,465 (0,277 – 0,653)	0,715	—	—	—	—	—

ABC: Área Bajo la Curva. IC: Intervalo de Confianza al 95%. \*p<0,05. S: Sensibilidad. E: Especificidad. VPP: Valor Predictivo Positivo. VPN: Valor Predictivo Negativo. CPT: Concentración de proteínas totales. ProMMP-2: Proforma de MMP-2. ProMMP-9: Proforma de MMP-9. MMP-9 a: Forma activa de MMP-9. Activación MMP-9: Relación entre formas activas v/s proforma + formas activas. MMP-8ELISA: MMP-8 medido con ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima. MMP8 IFMA: MMP-8 medida con ensayo inmunofluorométrico. DKK-1: Dickkopf-1. ON: osteonectina. TRAP: Fosfatasa ácida resistente a tartrato. OPG: Osteoprotegerina. PTN: Periostina.

## DISCUSIÓN

En la actualidad, el diagnóstico clínico-radiográfico es considerado el estándar de oro para el diagnóstico periodontal. Sin embargo, la evaluación clínico-radiográfica refleja el daño acumulado de episodios pasados de destrucción periodontal, y por lo tanto, carece de la capacidad para identificar el estado patológico actual (76). De este modo, surge la necesidad de evaluar biomarcadores como potencial método diagnóstico complementario, bajo el concepto de que variaciones en el perfil inflamatorio con similar fenotipo clínico pueden impactar en la susceptibilidad, severidad y progresión de la enfermedad (54, 76, 77). En el presente estudio se identificaron marcadores de metabolismo óseo en FCG con muy alta ( $ABC > 0,9$ ) y alta ( $ABC > 0,85$ ) precisión diagnóstica para el diagnóstico de PC y PAA, respectivamente.

Al comparar la actividad y/o niveles de los marcadores en muestras de FCG de sitios de dientes de sujetos con PC, PAA y controles sanos, se observó que proMMP-9, MMP-9a, porcentaje de activación de MMP-9 y MMP-8 (ELISA e IFMA) presentaron niveles mayores en sitios con PC, seguidos por PAA, en comparación con controles sanos, con diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos. A su vez, la CPT, ProMMP-2, TRAP y OPG fueron significativamente mayores en los sitios de sujetos con PC en comparación con PAA y sanos. En relación con las frecuencias de detección, también se observaron diferencias entre los grupos, con mayor frecuencia de detección

de ProMMP-2 en los sitios de sujetos con PC seguidos por PAA, en comparación con controles sanos. Del mismo modo, se identificó una mayor frecuencia de detección de PTN en sitios de sujetos con PC en comparación con PAA y sanos, y a su vez mayor frecuencia de detección de ON en sujetos con PAA en comparación a PC y sanos ( $p < 0,05$ ). Al respecto, este es el primer estudio que compara simultáneamente los cambios en la composición del FCG en relación a marcadores de metabolismo óseo entre individuos con PC, PAA y controles sanos. Las variaciones, tanto de las frecuencias de detección, como de la actividad y/o niveles de los marcadores estudiados, evidencian que el FCG refleja cambios en su composición en presencia de procesos inflamatorios crónicos del periodonto, tanto a nivel marginal como apical del diente. De forma similar al presente estudio, investigaciones realizadas previamente han reportado niveles elevados de MMPs -2, -8 y -9 en FCG, en asociación con severidad y respuesta al tratamiento de sitios de sujetos con PC (23, 24, 78-81); sin embargo la evidencia es más escasa para sujetos con PAA. Al respecto, se ha reportado en FCG de sujetos con PAA una mayor actividad gelatinolítica de MMP-2, y -9 en comparación con controles sanos (64, 68 y 69), de modo similar a lo observado en el presente estudio.

Para las comparaciones de actividad y/o niveles de los marcadores estudiados, se obtuvieron muestras de FCG mediante tiras de papel (Periopaper®) de los sitios con mayor profundidad al sondaje y un NIC  $\geq 3$ mm de dientes de sujetos con periodontitis crónica, debido al carácter sitio específico de la enfermedad (82, 83); sin embargo, las

muestras de FCG de sujetos con PAA se obtuvieron desde todo el perímetro del crévice del diente afectado (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, distolingual, lingual y mesiolingual), generando un pool de muestra por diente de acuerdo al procedimiento estandarizado en la literatura. Esto se explica en base a que la periodontitis apical afecta al diente, no a un sitio específico (64, 68). A pesar de esta diferencia en la unidad de medición definida en base al patrón de afección correspondiente a cada enfermedad, el método de obtención de muestra está estandarizado por 30 segundos y cada tira se eluyó a un mismo volumen final (80 µl de tampón TCL), de modo que los eluidos son comparables desde un punto de vista cuantitativo.

Los análisis de asociación entre variables moleculares y clínicas en sujetos con PC, revelaron una correlación directa estadísticamente significativa entre los niveles de ProMMP-2, MMP-9 activa, porcentaje de activación de MMP-9, niveles de MMP-8 (ELISA e IFMA) y TRAP con profundidad al sondaje y NIC. Del mismo modo, al estratificar las profundidades al sondaje en dos categorías ( $\leq 6$  mm y  $> 6$  mm), se observaron significativamente mayores niveles de ProMMP-2, MMP-9 activa, porcentaje de activación de MMP-9, MMP-8 (IFMA) y TRAP en los sitios con sacos profundos. Además, se observó una correlación indirecta estadísticamente significativa entre los niveles de TRAP y nivel óseo radiográfico ( $p < 0,05$ ). En concordancia con estudios previos (79), estos resultados sugieren una asociación entre marcadores de metabolismo óseo y severidad de periodontitis crónica. Sin embargo, no se observó

asociación entre los marcadores estudiados y TLA en sujetos con PAA; Si bien se ha reportado una asociación entre el tamaño de la lesión apical y la actividad gelatinolítica (75), probablemente esta última se relaciona en mayor medida con los cambios óseos radiográficos longitudinales que con el tamaño de la lesión apical en un momento dado, cuyo modelo de progresión podría presentar un patrón cíclico de activación-remisión, de forma similar a lo descrito en PC (84). Por otra parte, al asociar los marcadores del presente estudio con el hábito tabáquico no se observaron diferencias entre fumadores y no fumadores. Sin embargo, esto podría explicarse fundamentalmente por la falta de homogeneidad en la distribución de fumadores en los grupos de estudio. Se ha reportado una reducción del estado proinflamatorio local y en consecuencia de una menor extravasación de proteínas plasmáticas en el FCG de los sujetos fumadores. Como se ha descrito en estudios previos, la inflamación periodontal aumenta el volumen y las concentraciones de quimioquinas en FCG, mientras que el hábito tabáquico los reduce, lo que explicaría en parte los efectos adversos del hábito tabáquico en el proceso inflamatorio, afectando la respuesta del huésped frente al desafío bacteriano y promoviendo así la progresión de la enfermedad periodontal (85, 86).

En un estudio reciente se identificó una elevada precisión diagnóstica de MPO y MMP-8 determinadas mediante ELISA e IFMA ( $ABC > 0,9$ ), lo que se traduce en una alta capacidad discriminadora para el diagnóstico sitio específico de periodontitis crónica (82). Del mismo modo, el análisis de precisión diagnóstica en PC del presente estudio

reveló una muy alta precisión diagnóstica a nivel de sitio para los marcadores CPT, ProMMP-2, ProMMP-9, MMP-9 activa, MMP-8 (ELISA), y TRAP con áreas bajo la curva de 0,965, 0,911, 0,941, 0,954, 0,939 y 0,947, respectivamente. Paralelamente se obtuvieron puntos de corte óptimos utilizando el mayor índice de Youden para cada marcador. Para el diagnóstico de sitios con PC, el índice de Youden más alto obtenido fue para CPT, TRAP y MMP-9 activa, con niveles de sensibilidad de 87,1%, 88,89% y 90,32%, y de especificidad de 100%, 89,47% y 87,10%, respectivamente. Estos datos respaldan el potencial diagnóstico de estos marcadores biológicos que por primera vez han sido estudiados como método complementario para el diagnóstico sitio específico de PC.

Por otra parte, el análisis de precisión diagnóstica en dientes con PAA para el marcador MMP-8 (ELISA) reveló una alta capacidad discriminatoria con un  $ABC=0,869$ . Aplicando el índice de Youden, se obtuvo una sensibilidad de 92,00% y una especificidad de 76,67%. Este es el primer estudio que evalúa pruebas de precisión para el diagnóstico de PAA, revelando la potencial utilidad del análisis de MMP-8 (ELISA) para discriminar entre estados de salud-enfermedad del periodonto apical, mediante un método no invasivo como es el análisis del FCG. La determinación molecular complementaria del estado de salud-enfermedad del periodonto apical podría impactar en la toma de decisiones clínicas para el manejo oportuno de esta patología.

La determinación de marcadores moleculares de metabolismo óseo en FCG puede constituir una herramienta útil como potencial prueba complementaria al diagnóstico clínico-radiográfico de enfermedades inflamatorias crónicas con compromiso óseo del periodonto marginal y apical. El presente estudio, por primera vez determinó y comparó en forma simultánea las variaciones en la composición del FCG de las patologías osteodestructivas periodontales que constituyen las principales causas de pérdidas dentarias en adultos (5, 7). Al mismo tiempo y en base a estas variaciones, estableció los rendimientos de un set de marcadores de metabolismo óseo respecto de sus precisiones diagnósticas. Considerando que el diagnóstico clínico radiográfico presenta limitaciones ineludibles, ya que reflejan episodios pasados de destrucción del tejido periodontal y no el estado actual de la enfermedad (88), los resultados del presente estudio demuestran la potencial utilidad del análisis de marcadores biológicos en FCG como método complementario al diagnóstico clínico-radiográfico, aportando información sobre el estado actual de los pacientes, el perfil biológico en asociación con los parámetros clínicos y discriminando con una alta precisión estados de salud-enfermedad, tanto del periodonto marginal como apical del diente.

En general, los elevados rendimientos diagnósticos obtenidos sugieren profundizar el estudio de estos marcadores óseo-inflamatorios, tanto en el diagnóstico como en el seguimiento prospectivo de PC y PAA. Un aspecto a considerar para un análisis más detallado de una prueba diagnóstica, es que la definición del punto de corte se ajuste a

las necesidades diagnósticas requeridas. El índice de Youden identifica el punto de corte que determina la sensibilidad y especificidad más alta en forma conjunta; sin embargo, dicho punto de corte no necesariamente determina en forma individual la sensibilidad ni la especificidad más alta que podría alcanzar la prueba diagnóstica (87). Sobre la base de los resultados del presente estudio, el uso de estos biomarcadores presenta proyección en el diagnóstico precoz de la enfermedad, particularmente útil en periodontitis crónica, para lo cual es de rigor contar con pruebas diagnósticas altamente sensibles, o en la confirmación del resultado de un tratamiento o seguimiento de una lesión periodontal, especialmente útil para evaluar el resultado a corto plazo del tratamiento endodóntico en pacientes con periodontitis apical asintomática; donde el foco deberá centrarse en la búsqueda de pruebas diagnósticas con alta especificidad.

## CONCLUSIONES

1. El FCG muestra cambios en su composición en presencia de procesos inflamatorios crónicos del periodonto, tanto a nivel marginal como apical del diente.
2. Los cambios en el FCG de sujetos con periodontitis crónica, particularmente de ProMMP-2, MMP-9 activa, porcentaje de activación de MMP-9, MMP-8 y TRAP se asocian con severidad de la enfermedad.
3. La determinación de niveles de marcadores biológicos en FCG, particularmente CPT, MMP-2, MMP-9, MMP-8 y TRAP en sujetos con periodontitis crónica y MMP-8 en sujetos con periodontitis apical asintomática, puede constituir una herramienta útil como potencial prueba diagnóstica complementaria al diagnóstico clínico-radiográfico con una alta capacidad para discriminar estados de salud-enfermedad del periodonto marginal y apical, respectivamente.

## **RESUMEN**

**Introducción:** El fluido crevicular gingival (FCG) representa una potencial fuente de biomarcadores de enfermedades inflamatorias crónicas que afectan a los tejidos periodontales. Estas patologías constituyen las principales causas de pérdida dentaria en adultos. El objetivo del presente estudio fue evaluar niveles y precisión diagnóstica de un set de marcadores de metabolismo óseo en FCG de sujetos con periodontitis marginal crónica (PC) y de sujetos con periodontitis apical asintomática (PAA).

**Método:** En el presente estudio analítico transversal, los sujetos fueron seleccionados desde la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Las muestras de FCG se obtuvieron de sitios de dientes de sujetos con diagnóstico de PC (n=30), PAA (n=30) y controles sanos (n=30). La concentración de proteínas totales (CPT) fue determinada con el método del ácido bisciconínico. La actividad gelatinolítica de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) -2 y -9 fue determinada con zimografía y análisis densitométrico. Niveles de MMP-8 fueron determinados mediante ELISA e IFMA, mientras que marcadores óseos directos (DKK-1, osteonectina, periostina, TRAP y OPG), por el método cuantitativo multiplex. Para las comparaciones entre los grupos se realizó la prueba de Kruskal-Wallis utilizando el paquete estadístico Stata V12 y para la evaluación de precisión diagnóstica se realizó la construcción de curvas ROC y el

cálculo del área bajo la curva utilizando el programa estadístico SPSS19. Se consideró significación estadística con un valor  $p < 0,05$ .

Resultados: La proenzima, forma activa, tasa de activación de MMP-9 y nivel de MMP-8 (ELISA e IFMA) fueron significativamente mayores en sitios de individuos con PC, seguidos por PAA, en comparación con individuos sanos, con diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ( $p < 0,05$ ). La CPT, ProMMP-2, TRAP y OPG fueron significativamente mayores en los sitios de sujetos con PC en comparación con PAA y sanos ( $p < 0,05$ ). Al asociar los niveles moleculares de los marcadores con variables clínico-radiográficas en sujetos con PC, se observó una correlación directa estadísticamente significativa entre los niveles de Pro-MMP-2, MMP-9 activa, porcentaje de activación de MMP-9 y TRAP con profundidad al sondaje (PS) y nivel de inserción clínica (NIC) ( $p \leq 0,01$ ), de MMP-8 con PS ( $p \leq 0,01$ ) y de ON con NIC ( $p < 0,05$ ). Se observó además una correlación indirecta estadísticamente significativa entre TRAP y nivel óseo radiográfico (NOR) ( $p < 0,05$ ). El análisis de precisión diagnóstica de los marcadores reveló que CPT, ProMMP-2, ProMMP-9, MMP-9 activa, MMP-8 (ELISA), y TRAP presentaron un muy alto rendimiento en sitios de sujetos con PC, con áreas bajo la curva mayores a 0,9 y con valores de sensibilidad que fluctuaron entre un 77,42% y 96,77%, y de especificidad entre 80,65% y 100%. A su vez, en sitios de sujetos con PAA, MMP-8 (ELISA) presentó una alta precisión

diagnóstica con un área bajo la curva de 0,869, valores de sensibilidad de 92%, y de especificidad de 75,86%.

Conclusión: El FCG evidencia cambios en su composición en presencia de procesos inflamatorios crónicos del periodonto, tanto a nivel marginal como apical del diente, a su vez estos cambios se asocian con signos clínicos y radiográficos de destrucción periodontal. La determinación de marcadores moleculares en FCG podría constituir una herramienta útil como potencial método complementario al diagnóstico clínico-radiográfico de periodontitis crónica y periodontitis apical asintomática.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Jordan R.C., Diagnosis of periodontal manifestations of systemic diseases. *Periodontol 2000*, 2004. 34: p. 217-29.
2. De Sanctis M., Endo-periodontal relations. Microbiological and clinical aspects. *Dent Cadmos*, 1991. Sep 30;59(14):36-42, 45-54.
3. Armitage, G.C., Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 1999. 4(1): p. 1-6.
4. Demmer, R.T., Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*, 2010. 53: p. 28-44.
5. Gamonal, J., Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *J Periodontol*, 2010. 81(10): p. 1403-10.
6. Glickman, G.N., AAE Consensus Conference on Diagnostic Terminology: background and perspectives. *J Endod*, 2009. 35(12): p. 1619-20.

7. Takahashi, K., Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J*, 1998. 31(5): p. 311-25.
8. Hernandez M., Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol*, 2006. 77(11): p. 1863-70.
9. Hernandez M., Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *J Dent Res*. 2011 Oct;90(10):1164-70. Epub 2011 Apr 6. Review.
10. Sorsa T., Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis*, 2004. 10(6): 311-8.
11. Visse R., Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 2003. 92(8): p. 827-39.
12. Folgueras A.R., Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol*, 2004. 48(5-6): p. 411-24.

13. Sorsa T., Collagenase-2 (MMP-8) as a point-of-care biomarker in periodontitis and cardiovascular diseases. Therapeutic response to non-antimicrobial properties of tetracyclines. *Pharmacological Research*, 2011. 63: p. 108-113.
14. Hernandez M., Reduced expression of lipopolysaccharide-induced CXC chemokine in *Porphyromonas gingivalis*-induced experimental periodontitis in matrix metalloproteinase-8 null mice. *J Periodontal Res*. 2011 Feb;46(1):58-66.
15. Hernández P., Oral-fluid MMP analysis in the complementary diagnosis of periodontal diseases. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol.* 5(3); 150-153, 2012.
16. Wahlgren J., Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. *Int Endod J*. 2011 Aug;44(8):739-45. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01880.x. Epub 2011 Mar 30.
17. Matsui H., Expression of MMP-8 and MMP-13 in the development of periradicular lesions. *J Pathol*. 2001 Jun;194(2):217-24.

18. Pozo P., Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontal Res*, 2005. 40(3): p. 199-207.
19. Chung T., Correlation between plasma levels of matrix metalloproteinase (MMP)-9 /MMP-2 ratio and alpha-fetoproteins in chronic hepatitis carrying hepatitis B virus. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004. 19(5): p. 565-71.
20. Delaissé JM., Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta*, 2000. 291:223-234.
21. Snoek-van Beurden PA., Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*. 2005. 38:73-83.
22. Bannikov GA., Substrate binding of gelatin B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide. *J Biol Chem*. 2002. 277:16022-16027.
23. Hernandez M., 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.

24. Hernandez Rios M., Proteolytic roles of matrix metalloproteinase (MMP)-13 during progression of chronic periodontitis: initial evidence for MMP-13/MMP-9 activation cascade. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 1011-1017.
25. Holopainen JM., Activation of matrix metalloproteinase-8 by membrane type 1-MMP and their expression in human tears after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Jun;44(6):2550-6.
26. Ott SM. Sclerostin and Wnt signaling—the pathway to bone strength. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6741-6743.
27. Jackson A., Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells. *Bone* 2005;36:585-598.
28. Diarra D., Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat med.* 2007. 13;156-63.

29. Rossini M. Involvement of WNT/ $\beta$ -catenin signaling in the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2013 Aug;93(2):121-32. doi: 10.1007/s00223-013-9749-z. Epub 2013 Jun 11.
30. Ke HZ. Sclerostin and Dickkopf-1 as therapeutic targets in bone diseases. *Endocr Rev.* 2012 Oct;33(5):747-83. doi: 10.1210/er.2011-1060. Epub 2012 Jun 20.
31. Kristensen IB., Expression of osteoblast and osteoclast regulatory genes in the bone marrow microenvironment in multiple myeloma: only up-regulation of Wnt inhibitors SFRP3 and DKK-1 is associated with lytic bone disease. *Leuk Lymphoma.* 2013 Aug 5.
32. Dimitrios Daoussis. The Emerging Role of Dickkopf-1 in Bone Biology: Is It the Main Switch Controlling Bone and Joint Remodeling?. Elsevier Inc. All rights reserved. 2011. *Semin Arthritis Rheum* 41:170-177
33. Bradshaw AD. The role of SPARC in extracellular matrix assembly. *J Cell Commun Signal.* 2009 Dec; 3(3-4):239-46.

34. Termine JD. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981. 26(1 Pt 1):99-105.
35. Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontol 2000*. 2006; 41():196-217.
36. Canalis E., Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003;24:218-35.
37. Ng et al. Thrombospondin-2 and SPARC/osteonectin are critical regulators of bone remodeling. Delany AM, Hankenson KD *J Cell Commun Signal*. 2009 Dec; 3(3-4):227-38.
38. Delany AM., Thrombospondin-2 and SPARC/osteonectin are critical regulators of bone remodeling. *J Cell Commun Signal*. 2009 Dec; 3(3-4):227-38
39. Trombetta JM., SPARC/osteonectin functions to maintain homeostasis of the collagenous extracellular matrix in the periodontal ligament. *Histochem Cytochem*. 2010 Oct; 58(10):871-9.

40. Scannapieco. Salivary biomarkers associated with alveolar bone loss. *Ann N Y AcadSci.* 2007 Mar; 1098():496-7.
41. Horiuchi K., Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res.* 1999 Jul;14(7):1239-49.
42. Baril P., Periostin promotes invasiveness and resistance of pancreatic cancer cells to hypoxia-induced cell death: Role of the beta4 integrin and the PI3K pathway. *Oncogene* 2007, 26:2082-2094.
43. Riener MO., Expression of the extracellular matrix protein Periostin in liver tumors and bile duct carcinomas. *Histopathology* 2010, 56:600-606.
44. Siriwardena BS., Periostin is frequently overexpressed and enhances invasion and angiogenesis in oral cancer. *Br J Cancer* 2006, 95:1396-1403
45. Kudo Y., Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer. *Cancer Res* 2006, 66:6928-6935.

46. Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover in: Theoretical considerations and clinical use in osteoporosis. *Am J Med* 1993; 95:11S-6S
47. Toshiaki S., Experimentally Induced Periodontitis in Beagle Dogs Causes Rapid Increases in Osteoclastic Resorption of Alveolar Bone *Journal of Periodontology* April 1997, Vol. 68, No. 4, Pages 385-391
48. Gursoy UK., T. Salivary type I collagen degradation end-products and related matrix metalloproteinases in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2013 Jan;40(1):18-25. doi: 10.1111/jcpe.12020.
49. Simonet WS., Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997,89:159-61.
50. Nawasawua T., Roles of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontology* 2000 Volume 43, Issue 1, pages 65–84, February 2007.

51. Burguera B., Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology* 2001 ,142:3546-53.
52. Bostanci N., Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol.* 2007 May;34(5):370-6.
53. De Paula-Silva F.W., Accuracy of periapical radiography and cone-beam computed tomography scans in diagnosing apical periodontitis using histopathological findings as a gold standard. *J Endod*, 2009. 35(7):p. 1009-12.
54. Balwant., Biomarkers of periodontitis in oral fluids. *Journal Oral Science*, 2008. 50(1): p. 53-56.
55. Patel, S., et al., New dimensions in endodontic imaging: part 1. Conventional and alternative radiographic systems. *Int Endod J*, 2009. 42(6): p. 447-62.
56. Trope, M., Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. *J Endod*, 1999. 25(5): p. 345-50

57. Penesis, V.A., Outcome of one-visit and two-visit endodontic treatment of necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized controlled trial with one-year evaluation. *J Endod*, 2008. 34(3): p. 251-7.
58. Weiger R., Prognosis of conventional root canal treatment reconsidered. *Endod Dent Traumatol*, 1998. 14(1): p. 1-9.
59. Pezelj-Ribaric., Tumor necrosis factor-alpha in peripical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *Mediators Inflamm*, 2007. 2007: p. 69416.
60. Curtis, M.A., et al., The protein composition of gingival crevicular fluid sampled from male adolescents with no destructive periodontitis: baseline data of a longitudinal study. *J Periodontal Res*, 1990. 25(1): p. 6-16.
61. Adonogianaki, E., Detection of stable and active periodontitis sites by clinical assessment and gingival crevicular acute-phase protein levels. *J Periodontal Res*, 1996. 31(2): p. 135-43.

62. Oringer, R.J., Modulation of the host response in periodontal therapy. *J Periodontol*, 2002. 73(4): p. 460-70.
63. McCauley L.K., Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol*, 2002. 73(11): p. 1377-91.
64. Garrido M., Levels of TNF- $\alpha$  increase in gingival crevicular fluid of teeth with asymptomatic apical periodontitis. . *Rev. clín. periodoncia implantol. rehabil. oral* 2011. 4((3)): p. 130-133.
65. Makela M., et al., Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res*, 1994. 73(8): p. 1397-406.
66. Maeso, G., Levels of metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis, gingivitis, and healthy gingiva. *Quintessence Int*, 2007. 38(3): p. 247-52.

67. Kardesler, L., et al., Gingival crevicular fluid IL-6, tPA, PAI-2, albumin levels following initial periodontal treatment in chronic periodontitis patients with or without type 2 diabetes. *Inflamm Res*, 2011. 60(2): p. 143-51.
68. Belmar MJ., Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008: 105: 801-806.
69. Burgener B., Biologic markers for odontogenic periradicular periodontitis. *J Endod* 2010: 36: 1307-1310.
70. Shin SJ., Matrix metalloproteinase-8 and substance P levels in gingival crevicular fluid during endodontic treatment of painful, nonvital teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011: 112: 548-554.
71. Bowers MR, Fisher LW. Connective tissue-associated proteins in crevicular fluid: potential markers for periodontal diseases. *J Periodontol*. 1989 Aug;60(8):448-5

72. Shibutani T., Experimentally induced periodontitis in beagle dogs causes rapid increases in osteoclastic resorption of alveolar bone. *J Periodontol.* 1997 Apr;68(4):385-91
73. Hernandez M., MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 729-735.
74. Gutmann, J.L., et al., Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states. *J Endod*, 2009. 35(12): p. 1658-74.
75. Dezerega A. Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response. *J Inflamm (Lond)*. 2012; 9: 8.
76. Offenbacher, S., Periodontal disease at the biofilm-gingival interface. *J Periodontol* (2007) 78, 1911-1925. doi:10.1902/jop.2007.060465. Accepted Article.

77. Kinane, D., Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* (2011) 38 Suppl 11, 44-48. doi:10.1111/j.1600051X.2010.01682.x.
78. Mantyla P., Monitoring periodontal disease status in smokers and nonsmokers using a gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8-specific chair-side test. . (2006) *Journal of Periodontal Research*41, 503–512.
79. Marcaccini A. M., Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology* (2010) 37, 180–190.
80. Reinhardt R. A. Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis. *Journal of Periodontology* (2010) 81, 251–259
81. Sorsa, T. Detection of gingival crevicular fluid MMP-8 levels with different laboratory and chair-side methods.*Oral Diseases*. (2010) 16, 39–45.

82. Leppilahti JM., Matrix metalloproteinases and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid provide site specific diagnostic value for chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 348–356 doi: 10.1111/jcpe.12223
83. Chapple IL., Periodontal disease diagnosis: current status and future developments. *J Dent.* 1997 Jan;25(1):3-15.
84. Socransky SS., New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1984 Jan;11(1):21-32
85. Mokeem SA., Influence of smoking on clinical parameters and gingival crevicular fluid volume in patients with chronic periodontitis. *Oral Health Dent Manag.* 2014 Jun;13(2):469-73.
86. Haytural O., Impact of periodontitis on chemokines in smokers. *Clin Oral Investig.* 2014 Sep 6.

87. Cerda J., Using ROC curves in clinical investigation. Theoretical and practical issues. *Rev. chil. infectol.* vol.29 no.2 Santiago abr. 2012.
  
88. Buduneli N., Host derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2011. 38(Suppl.11), 85–105.

## Anexo 1: Formulario Consentimiento Informado Aprobado por Comité Bioética FONDECYT. (muestras PC y Sanos)

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Odontología - Departamento de Odontología Con

N° 28-04-01  
COMITE ASESOR  
DE BIOÉTICA  
FONDECYT

Facultad de Odontología  
Universidad de Chile

Proyecto de Investigación  
Académico Responsable: Jorge Gamonal

Consentimiento Informado-Paciente con Periodontitis

Aspectos Generales

La periodontitis es una infección producida por el acumulo de placa bacteriana entre la encía y el diente, que produce en sus estados iniciales el aumento de volumen, el cambio de color y el sangrado de la encía, y luego si no es tratada oportunamente ocasiona la pérdida de los dientes, enfermedad denominada periodontitis.

El tratamiento de la enfermedad periodontal permite eliminar la infección y además permite detener la destrucción del hueso alveolar al cual se haya unido el diente.

El propósito del presente estudio es determinar que factores locales y generales, pueden estar asociados con la periodontitis, que pueden contribuir a la destrucción del tejido de inserción del diente y pérdida de los dientes. El rol de los factores locales, lo determinaremos tomando y luego comparando, unas muestras biológicas en sujetos con periodontitis crónica, agresiva y sujetos sin periodontitis.

En general, hay un tipo de periodontitis que afecta a los sujetos mayores de 35 años, y que se denomina periodontitis crónica y otra que afecta a individuos más jóvenes, entre 25 y 34 años, que se denomina periodontitis agresiva. El diagnóstico de la periodontitis se hace luego del examen clínico.

Los sujetos sanos, son aquellos que no tienen periodontitis.

Procedimiento toma de las muestras

A los pacientes con periodontitis y sujetos sin periodontitis, seleccionados para el presente estudio se les efectuara un examen clínico completo, en el que se determina la severidad y la extensión de la infección periodontal. Este es un examen de rutina que se hace a todos los pacientes con periodontitis, participen como de un estudio de investigación.

A los pacientes que participen del estudio se les tomara 3 tipos de muestras:

- 1.- Una biopsia de encía, que se toma cuando se indica tratamiento quirúrgico de la infección periodontal. Esta biopsia se tomará, como parte del tratamiento de cirugía periodontal que normalmente se hace a los pacientes con periodontitis crónica severa generalizada y que no tiene inconvenientes para el paciente. Esta biopsia se toma realizando una incisión con hoja de bisturí N° 15. Esta biopsia se usará para aislar células que participan en la respuesta inflamatoria del paciente frente a la infección periodontal.
- 2.- Una muestra de fluido gingival crevicular (líquido que normalmente fluye entre la encía y el diente y que esta presente en todos los sujetos), que se toma con una tira de papel y que no tiene ningún inconveniente para el paciente
- 3.- Una muestra de sangre periférica, tomada por una enfermera que trabaja en la Facultad de Odontología. La muestra se toma en el brazo, la cantidad es de 15 ml, y el inconveniente puede ser un hematoma en el brazo, en algunas oportunidades.

## Anexo 2: Formulario Aprobación Comité Bioética FONDECYT. (muestras PAA)



Comisión Nacional de Investigación  
Científica y Tecnológica - CONICYT

### INFORME DE ASPECTOS BIOÉTICOS CONCURSO NACIONAL DE PROYECTOS FONDECYT REGULAR 2012

<b>N° Proyecto</b>	1120138
<b>Investigador/a Responsable</b>	EMMA MARCELA HERNANDEZ RIOS
<b>Título</b>	CROSSTALK BETWEEN LOCAL HOST RESPONSE TO ENDODONTIC INFECTION AND LOW-GRADE SYSTEMIC INFLAMMATION IN ASYMPTOMATIC APICAL PERIODONTITIS: PROSPECTIVE STUDY EVALUATING THE EFFECT OF CONSERVATIVE ENDODONTIC TREATMENT
<b>Institución</b>	UNIV.DE CHILE/FAC.DE ODONTOLOGIA
<b>Grupo de Estudio</b>	MEDICINA G2-G3
<b>Fecha</b>	Santiago, 25 de enero de 2012

#### Observaciones:

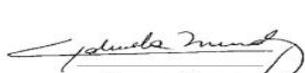
Adjunta acta de aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, con fundamentación.

Adjunta Consentimiento Informado (CI) para pacientes con periodontitis apical asintomática, otro para padres de menores con dientes sanos (controles) y asentimiento informado para estos menores, que son adecuados.

#### Conclusiones:

- Sin observaciones.

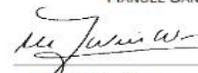
Este informe ha sido preparado por los miembros del Comité Asesor de Bioética de FONDECYT.

  
GABRIELA MÉNDEZ

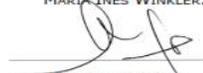
  
RAFAEL TÉLLEZ

  
MANUEL SANTOS

  
MARÍA ÁNGÉLICA SOTOMAYOR

  
MARÍA INÉS WINKLER.

  
RODRIGO SALINAS

  
RAÚL VILLARROEL



**Anexo 3: Formulario Consentimiento Informado Aprobado por Comité Bioética FONDECYT y FOUCH. (muestras PAA)**

Ed. 30/07/2011

**DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE**

PROYECTO PATROCINADO POR FONDECYT 2011: "ASOCIACIÓN ENTRE LA RESPUESTA LOCAL DEL HOSPEDERO FRENTE A LA INFECCIÓN ENDODÓNTICA E INFLAMACIÓN SISTÉMICA DE BAJO GRADO EN PERIODONTITIS APICAL ASINTOMÁTICA. ESTUDIO LONGITUDINAL PARA EVALUAR LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO ENDODÓNTICO CONSERVADOR"

**Versión 1, pacientes 18 años o más**

**Antecedentes generales:** Usted ha sido invitado a participar voluntariamente en un estudio titulado "Asociación entre la respuesta local del hospedero frente a la infección endodóntica e inflamación sistémica de bajo grado en Periodontitis Apical Asintomática. Estudio longitudinal para evaluar los efectos del tratamiento endodóntico conservador". Esta enfermedad corresponde a una infección de origen dental que generalmente se produce por caries no tratadas y genera una lesión destructiva en los tejidos que rodean la raíz del diente. El tratamiento de estas lesiones es la extracción del diente afectado o el tratamiento endodóntico (instrumentación y desinfección del conducto de la raíz dentaria), ambos con el objetivo de eliminar la infección y evitar las complicaciones asociadas a esta enfermedad. En términos generales, el objetivo del presente estudio es caracterizar la presencia de inflamación local, en los tejidos que rodean el diente, (a partir de dientes extraídos y fluido de la encía) y sistémica, es decir en tejidos u órganos distantes al diente mediante análisis de la sangre en este último caso, como consecuencia de esta enfermedad y las bacterias que la provocan. Esto permitirá determinar si la presencia de estas lesiones podría implicar un riesgo en la producción de otras enfermedades, tales como enfermedades cardiovasculares y el efecto del tratamiento endodóntico sobre este potencial riesgo. Con este fin, se incluirán pacientes con periodontitis apical asintomática (enfermedad en estudio) y se excluirán aquellos pacientes que presenten enfermedades generales y periodontitis crónica, dado que estas podrían influir sobre los resultados. Este formulario será explicado por el investigador y se entregará a los participantes para su lectura. El participante podrá retirarse del estudio cuando lo desee y sus datos serán eliminados a partir de ese momento.

**Procedimiento:** Se incluirán pacientes con diagnóstico de diente con Periodontitis Apical Asintomática y controles sin el problema dental, ninguno con enfermedades generales. Cuando esté indicado, el especialista en endodoncia lo realizará el tratamiento de

23/04/2012  
COMITE ASESOR  
DE BIOÉTICA  
FONDECYT

Ed. 30/07/2011

**FORMULARIO CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES ADULTOS**

Investigador responsable: Dra. Marcela Hernández Ríos; Marcela Hernández Ríos;  
Depto. de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Fonc: 9781808;  
email: [mhermandezrios@gmail.com](mailto:mhermandezrios@gmail.com).

Yo..... estoy dispuesto a participar en el proyecto de investigación. He leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente. Al firmar esta copia, indico que tengo un entendimiento claro del proyecto:

Firma

Ante cualquier duda puedo preguntar al Comité de Ética de la Facultad de Odontología cuyo presidente es el Dr. Juan Cortés; teléfono: 9781702 y su dirección es Facultad de Odontología de la U. de Chile, Edificio Administrativo, Oficina Vicedecanato, 4º piso, Sergio Livingston P. 943, Independencia.

Al sujeto de investigación he entregado información sobre el estudio, y en mi opinión esta información es precisa y suficiente para que el sujeto entienda completamente la naturaleza, los riesgos y beneficios del estudio, y los derechos que tiene en tanto sujeto de investigación. No ha existido coerción ni ha actuado bajo influencia alguna.

He sido testigo que el sujeto firmó el documento:

Nombre del Investigador:.....

Firma del Investigador: ..... Fecha: .....

