

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA Y PATOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA PERIODONTAL**

**“EXPRESIÓN DE METALOPROTEINASA DE MATRIZ EXTRACELULAR-13
(MMP-13) EN DIENTES CON PERIODONTITIS APICAL ASINTOMÁTICA”**

Paulina Andrea González de la Fuente

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Marcela Hernández Ríos

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Andrea Dezerega Piwonka

Prof. Dr. Nicolás Dutzan Muñoz

**Financiamiento,
Proyecto DI INI 07/02-2,
FONDECYT 1090461**

**Santiago - Chile
2010**

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores guías de tesis: Dra. Marcela Hernández, Dra. Andrea Dezerega y Dr. Nicolás Dutzan, por su excelente disposición, ayuda y orientación en todo lo que necesité durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A todo el equipo del Laboratorio de Biología Periodontal, en especial al Dr. Mauricio Garrido y Tc. Leslie Henríquez, por su constante alegría y gran ayuda en el manejo de las técnicas de laboratorio.

A los docentes y alumnos de la Cátedra de Cirugía 2008, por su colaboración en la toma de muestras en la Clínica de la Facultad, y a mi compañera Jeannette Mardones por acompañarme en esta labor.

ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen	4
Introducción	6
Marco teórico	
- Periodontitis apical asintomática (PAa)	9
- Metaloproteinasas (MMPs) y PAa	11
- Metaloproteinasa de matriz extracelular-13 (MMP-13)	13
- MMPs en fluido gingival crevicular (FGC)	15
Hipótesis	17
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	17
Materiales y Método	18
Resultados	22
Discusión	26
Conclusiones	30
Referencias Bibliográficas	31
Anexos	
- Formulario de Consentimiento Informado	35
- Ficha clínica	37

RESUMEN

“Expresión de Metaloproteinasa de Matriz Extracelular -13 (MMP-13) en dientes con Periodontitis Apical Asintomática”

Introducción

La periodontitis apical asintomática (PAa) es una respuesta inmunoinflamatoria local a la invasión microbiana de la pulpa, que resulta en la destrucción de los tejidos periapicales. La metaloproteinasa de matriz extracelular -13 (MMP-13) es una colagenasa capaz de degradar los principales componentes del periodonto y hueso alveolar, por lo que podría estar implicada en la patogénesis de las lesiones periapicales (LPAs) y su caracterización en el fluido gingival crevicular (FGC) podría reflejar el estado de salud/enfermedad de los tejidos periapicales. El objetivo de este estudio es comparar los niveles de MMP-13 en FGC de dientes con PAa y de dientes sanos; y asociar los niveles de MMP-13 en FGC de dientes con PAa y en homogeneizados de sus respectivas LPAs.

Materiales y Método

Se seleccionaron 12 pacientes con diagnóstico clínico y radiográfico de PAa, indicación de exodoncia y libres de enfermedad periodontal. Se obtuvieron muestras de FGC de dientes con PAa, FGC de dientes contralaterales sanos y biopsias de LPAs, obtenidas luego de las exodoncias de los dientes con PAa. Se determinó la concentración de proteínas totales de las muestras y se determinaron los niveles de MMP-13 mediante Immunowestern blot. La intensidad de las bandas se midió por análisis densitométrico con el programa Un Scan iT ®. El análisis estadístico se realizó con la ayuda del software Stata v10.

Resultados

MMP-13 se expresa en FGC de dientes sanos, FGC de dientes con PAa y en homogeneizados de LPAs, tanto en su forma zimogénica como en su forma activa. Para ambas formas enzimáticas, los niveles de MMP-13 en FGC de dientes

con PAa fueron significativamente mayores que en sanos. Hubo una correlación positiva significativa entre los niveles de proMMP-13 en FGC y en homogeneizados de LPAs de dientes con PAa, no así para los niveles de MMP-13 activa.

Conclusiones

MMP-13 participaría en la génesis y/o progresión de la PAa, probablemente contribuyendo en el proceso de destrucción ósea en LPAs. Los niveles de MMP-13 en FGC podrían reflejar la progresión de las LPAs, mientras que el FGC podría ser una herramienta útil en el estudio de la PAa, ya que reflejaría los cambios en el estado de salud o enfermedad de los tejidos periapicales.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis apical asintomática (PAa) corresponde a la inflamación y destrucción de los tejidos perirradiculares causadas por agentes etiológicos de origen endodóntico ^[1]. Es una enfermedad infecciosa que resulta en la destrucción progresiva del ligamento periodontal y del hueso alveolar debido a la compleja interacción entre las bacterias y la respuesta inmune del hospedero ^[2, 3], originándose una lesión periapical (LPA), que puede corresponder a un granuloma apical o bien a un quiste radicular inflamatorio ^[4].

En el desarrollo de las LPAs participan diversas células inflamatorias tales como macrófagos, linfocitos B y T, células plasmáticas y polimorfonucleares neutrófilos (PMN) ^[5]. Además de elementos celulares, se han descrito variados mediadores inflamatorios que están presentes en estas lesiones, tales como interleuquinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), óxido nítrico (NO), interferon gamma (IFN- γ), prostaglandinas y metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) ^[4, 6-8]; pero no se ha determinado claramente el mecanismo por el cual se induce la destrucción de estos tejidos. Se acepta que durante la progresión de las LPAs existen períodos de actividad, donde habría destrucción tisular activa, y períodos de inactividad, donde no habría un avance de la lesión ^[9, 10].

Las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) son una amplia familia de endopeptidasas dependientes de calcio y zinc que actúan a pH neutro y que en conjunto son capaces de degradar casi todos los componentes de membrana basal y de la matriz extracelular (MEC), como colágeno, fibronectina, laminina y proteoglicanos ^[11]. Se clasifican según su especificidad por sustrato y estructura en cinco subgrupos: colagenasas (MMP-1, -8 y -13), gelatinasas (MMP-2 y -9), estromelisininas (MMP-3, -10 y -11), MMPs asociadas a membrana y otras MMPs ^[9, 12-16].

En las enfermedades periodontales, se ha demostrado que ciertas citoquinas inflamatorias y patógenos periodontales, como *Porphyromonas gingivalis*, causan

la activación y sobreexpresión de MMPs, y particularmente aquellas con actividad colagenasa se han visto patológicamente aumentadas en tejido gingival y en fluido gingival crevicular (FGC) de dientes con periodontitis crónica, en asociación con la severidad de la enfermedad [2, 17]. Los niveles de MMPs también se han visto elevados en pulpitis y LPAs [3, 13, 15, 18-22].

La MMP-13 corresponde a una colagenasa cuya especificidad de sustrato incluye al colágeno I, II y III [9]. La evidencia plantea que la MMP-13 tendría un rol significativo en la iniciación y progresión de la reabsorción ósea [2]. De hecho, se ha demostrado una fuerte asociación entre MMP-13 y la destrucción de hueso y cartílago en artritis reumatoidea y osteoartritis [23, 24]. En boca, su expresión se ha asociado con la pérdida ósea presente en peri-implantitis [25] y periodontitis [23]. Distintos estudios han encontrado niveles aumentados de MMP-13 en tejido gingival inflamado y fluido gingival crevicular (FGC) de dientes con periodontitis crónica, al compararlos con dientes sanos [2, 9, 23, 26, 27]. También se ha demostrado un aumento en la actividad de la MMP-13 durante los períodos de progresión de la periodontitis crónica y se ha asociado con el grado de reabsorción ósea alveolar [2, 10]. Mediante inmunohistoquímica, se ha demostrado la expresión de MMP-13 en LPAs [4, 13, 28], asociada con la destrucción característica de los tejidos periapicales en estas lesiones. Además, se ha postulado que esta colagenasa podría tener un rol crucial en la formación de un quiste radicular a partir de un granuloma inflamatorio [3, 13]. Todos estos hallazgos, sugieren que MMP-13 podría estar implicada en la patogénesis de la patología periapical, participando en la degradación de los tejidos blandos y duros de soporte periodontal.

El FGC contiene mediadores bioquímicos, entre ellos las MMPs, que reflejan el estado metabólico de los tejidos periodontales [4]. Se ha visto que en ausencia de enfermedad periodontal el FGC representa un transudado de líquido intersticial de los tejidos periodontales, pero durante la presencia de patología periodontal, éste se transforma en un verdadero exudado inflamatorio [29], que contiene mediadores y productos de degradación provenientes de los tejidos periodontales, y por tanto, potenciales biomarcadores. Estos podrían ser útiles para determinar presencia o ausencia de patología perirradicular, o bien progresión versus

reparación. La muestra de FGC es fácil de obtener, rápida, no invasiva y ha sido ampliamente usada en investigación en periodoncia ^[9].

Por lo anteriormente expuesto, en este proyecto de tesis proponemos que los niveles de MMP-13 aumentan en LPAs de dientes con periodontitis apical asintomática, en comparación con dientes sanos, y que se reflejarían en el FGC de los dientes afectados.

MARCO TEÓRICO

Periodontitis apical asintomática (PAa)

En condiciones normales, el esmalte y la dentina protegen a la pulpa dental de los microorganismos presentes en la cavidad oral. Sin embargo, a consecuencia de caries, fracturas, cracks, sacos periodontales o procedimientos clínicos, la pulpa puede verse expuesta al medio oral e infectarse por microflora autógena, desencadenando una respuesta inmuno-inflamatoria que involucra principalmente polimorfonucleares neutrófilos (PMN), macrófagos, linfocitos y células plasmáticas^[30]. Generalmente, los mecanismos defensivos de la pulpa no son capaces de erradicar la infección. A medida que pasa el tiempo y los irritantes microbianos persisten, los canales radiculares son invadidos y el proceso inflamatorio avanza hacia el periápice induciendo necrosis pulpar y generando un habitat que favorece el desarrollo de una flora mixta, predominantemente anaerobia y Gram (-), que se organiza en biofilms y se adhiere firmemente al conducto radicular^[1, 31-35]. A consecuencia del flujo de productos bacterianos a través del foramen apical, se produce una inflamación aguda del ligamento periodontal apical y del tejido óseo vecino, produciéndose la acumulación, activación e interacción coordinada de células inmuno-inflamatorias en el área periapical, donde participan mediadores inflamatorios, metabolitos, moléculas efectoras y anticuerpos^[1, 8, 12, 33, 36].

Esta respuesta, si bien limita efectivamente la diseminación de bacterias desde el canal radicular al hueso subyacente, también resulta en la destrucción de componentes tisulares, pérdida de ligamento periodontal y reabsorción de hueso periapical, cemento radicular y dentina^[1, 4, 5, 12]. La compleja interacción entre macrófagos, linfocitos B y T, células plasmáticas, PMN, fibroblastos, células epiteliales, osteoblastos, osteoclastos, mediadores inflamatorios y MMPs, provoca la degradación de la matriz extracelular periodontal, una franca reabsorción ósea y la formación de un tejido de granulación, estableciéndose un proceso crónico y asintomático en el área periapical^[1, 3, 4, 8, 15, 33, 37]. De este modo, se forma una

lesión periapical (LPA) que representa una barrera defensiva para evitar que la invasión microbiana se propague al hueso [8, 12, 30]. Las LPAs son las lesiones osteolíticas más comunes en los maxilares [13] y, como se ha descrito, se forman a consecuencia de la respuesta local inmunoinflamatoria frente a la infección de la pulpa [5, 33].

Radiográficamente, las LPAs se manifiestan como zonas radiolúcidas que rodean el ápice dentario, cuyo tamaño y morfología permiten evaluar el progreso o reparación de la lesión [5]. El diagnóstico diferencial entre granulomas y quistes, basándose sólo en la imagen radiográfica, resulta insuficiente, por lo que el análisis histológico es necesario para confirmar el diagnóstico de la lesión [28].

Tanto los granulomas periapicales como los quistes radiculares, son parte del mismo proceso inflamatorio, pero representado en dos etapas distintas [13]. En ambos tipos de lesiones, hay un infiltrado inflamatorio crónico que se mantiene asociado a la degradación de matriz extracelular y reabsorción ósea [19].

Los granulomas periapicales consisten en un tejido inflamatorio de granulación altamente infiltrado por células y circunscrito por una cápsula de tejido conectivo fibroso, que se adhiere firmemente a la superficie radicular [1, 32]. Como principales elementos celulares que los componen, se encuentran los macrófagos, linfocitos B y T, y células plasmáticas [4, 5, 13], junto con células no inflamatorias como fibroblastos, osteoblastos y osteoclastos [33]. Células epiteliales con una capacidad proliferativa latente, derivadas de los restos epiteliales de Malassez presentes en el ligamento periodontal, también son un hallazgo frecuente en la patología periapical [19, 38]. En el proceso inflamatorio periapical, estos restos epiteliales son inducidos a dividirse y proliferar producto de la actividad de mediadores inflamatorios, tales como citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento [38], lo que puede resultar en la formación de un quiste radicular inflamatorio a partir de un granuloma periapical [3, 13, 38].

Los quistes periapicales se caracterizan por ser una cavidad recubierta por epitelio escamoso estratificado [28, 32, 38] con un infiltrado inflamatorio crónico compuesto por numerosos linfocitos T y macrófagos [1]. Se cree que se forman a partir de la proliferación de los restos epiteliales de Malassez en los tejidos

periapicales inflamados [38].

El tratamiento de estas lesiones se basa en una correcta terapia endodóntica, para eliminar la infección y prevenir la recontaminación, de manera de lograr la reparación de los tejidos periapicales y la remisión de la lesión [5, 12, 32]. Algunos autores sugieren que, a diferencia de los granulomas, los quistes repararían más lentamente después de la terapia endodóntica y podrían necesitar un tratamiento quirúrgico adicional [28, 38].

Metaloproteinasas (MMPs) y PAa

Diversos mediadores inflamatorios, citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento liberados por diferentes células residentes en los tejidos periapicales, se han asociado con la formación de las LPAs [19], pero la interacción específica y el rol que cumplirían en este complejo proceso aún no se ha logrado caracterizar por completo. En el caso de las MMPs, su participación en procesos inflamatorios crónicos y patologías que involucran destrucción de tejido es evidente, pero aún poco claro [14].

Las MMPs son una familia de 24 endopeptidasas [3, 19], de las cuales 23 se han encontrado en humanos [3, 16, 35, 39]. En conjunto, son capaces de degradar la mayoría de los componentes de la matriz extracelular y de membrana basal: colágeno, fibronectina, laminina, gelatina y proteoglicanos [1, 14, 17]. En los últimos años, se han descubierto numerosos sustratos bioactivos como blancos de la actividad de las MMPs, tales como proteinasas, citoquinas, inhibidores de proteinasas, factores de coagulación, moléculas quimiotácticas, factores de crecimiento, receptores de superficie celular y moléculas de adhesión [19, 40, 41].

Casi todas las MMPs, a excepción de las MMPs -11 y -28, son sintetizadas como pro-formas latentes y deben ser activadas en los tejidos blanco para ejercer su acción [28, 35, 42]. La activación in vivo de las MMPs implica la remoción de uno de sus dominios por parte de otras proteasas, las cuales generalmente forman parte de una cascada proteolítica en el espacio pericelular [41]. Luego de su síntesis, las MMPs pueden ser secretadas o bien almacenadas en gránulos

inflamatorios celulares ^[19].

Estas enzimas proteolíticas son expresadas por una amplia gama de células, dentro de las que se incluyen macrófagos, neutrófilos, leucocitos, fibroblastos, células epiteliales, condrocitos, osteoblastos, queratinocitos, células mesenquimáticas, células endoteliales ^[9, 23, 35], y se ha visto que están involucradas en la degradación fisiológica y patológica de las proteínas de la MEC y membrana basal ^[2]. Su transcripción es regulada por diversas citoquinas, factores de crecimiento y componentes de matriz extracelular ^[3]. Dentro de los procesos fisiológicos, las MMPs participan en la organogénesis, el crecimiento, diferenciación y remodelación tisular, mientras que su expresión en tejidos adultos es relativamente baja. En condiciones patológicas, sus niveles y/o actividad aumentan significativamente, como es el caso de ciertas enfermedades inflamatorias, tumorales y metástasis, resultando en la degradación de matriz extracelular y destrucción tisular patológica ^[11, 14, 17, 39, 43]. Se ha postulado que estas enzimas tendrían una participación activa en la caries dentinaria ^[39] y en la destrucción de los tejidos pulpares, periodontales y periapicales en procesos inflamatorios crónicos ^[3, 4, 13, 18, 22].

Dentro de la familia de las MMPs, las colagenasas y las gelatinasas poseen un rol significativo en la degradación directa de colágeno en tejido blando y hueso ^[10]. Específicamente, las colagenasas desintegran el colágeno fibrilar intersticial, siendo éste el principal componente del periodonto y hueso alveolar ^[16, 17, 44]. A medida que el colágeno va desintegrándose en fragmentos más pequeños, éste se desnaturaliza a temperatura corporal, para luego ser degradado por las gelatinasas y otras proteínas no específicas de tejido ^[3, 4, 45]. Las colagenasas también pueden hidrolizar otros sustratos, pero éstas son las únicas enzimas capaces de destruir el colágeno fibrilar ^[13].

La actividad proteolítica de las MMPs está sujeta al control de una serie de inhibidores endógenos, siendo los principales la α 2-macroglobulina, la cual bloquea su acción en plasma y en fluidos corporales, y los inhibidores endógenos tisulares específicos (TIMPs), los cuales forman complejos con estas enzimas uniéndose a su sitio activo y, por consiguiente, inhibiendo su acción ^[16, 35, 41, 42].

Los TIMPs pertenecen a una familia multigénica que codifica para 4 proteínas: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 [16, 35]. Son expresados en muchos tejidos por distintos tipos celulares y también están presentes en fluidos corporales como el FGC [46]. En condiciones patológicas, como cáncer, artritis reumatoídea y periodontitis, se ha encontrado un desequilibrio a favor de las MMPs entre los niveles de estas enzimas y sus TIMPs [46].

Metaloproteinasa de matriz extracelular-13 (MMP-13)

La MMP-13, también conocida como colagenasa-3, corresponde a un polipéptido de 471 aminoácidos cuyo gen se ubica en el cromosoma 11q [11]. Es una enzima expresada por condrocitos, fibroblastos, osteoblastos, células periostales, células epiteliales, PMN, células plasmáticas, células tipo macrófago, membrana sinovial, carcinoma escamoso y células tumorales [14, 23, 30, 42]. Citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, TNF- α y PGE2 inducen su expresión [4, 23, 44]. La MMP-13 es secretada como un propéptido inactivo, siendo necesaria la proteólisis de uno de sus dominios para que la enzima se active [43].

Su especificidad de sustrato es más amplia que la de otras colagenasas [14]. Junto con las colagenasas -1 y -2, la MMP-13 degrada la estructura triple helicoidal del colágeno fibrilar tipo I, II y III, principales componentes del ligamento periodontal y de la matriz ósea alveolar, siendo más activa para colágeno tipo II [11, 25, 43, 47]. Además, es capaz de degradar colágeno tipo IV, IX, X y XIV, gelatina, proteoglicanos, fibronectina, tenasina, fibrilina, α 2-antiquimiotripsina e inhibidor del activador del plasminógeno (PAI)-2 [11, 13, 14, 23, 47].

La proMMP-13 tiene un peso molecular (PM) de 60 KDa y compromete tres dominios proteicos: un dominio C-terminal, esencial para su actividad colagenasa; un dominio catalítico, que contiene el sitio activo de la enzima; y un dominio propéptídico, compuesto por 85 aminoácidos y que se pierde durante la activación [11, 43, 47]. Para que proMMP-13 se active, debe haber un primer corte en el sitio Gly³⁵-Ile³⁶, que genera un fragmento intermedio de 56 KDa, y un segundo corte en el sitio Tyr⁸⁵ N-terminal, que genera la forma enzimática totalmente activa de 48

KDa ^[4, 9, 11] y de vida corta ^[39]. Una vez activa, la MMP-13 se vuelve altamente inestable, generando fragmentos degradados de bajo peso molecular ^[4, 48].

La acción de MMP-13 activa puede ser inhibida por todos los tipos de TIMPs, con los cuales forma complejos por medio de enlaces no covalentes ^[11, 42, 47]. Estudios de análisis cinético han demostrado que MMP-13 interactúa con TIMP-3 1.2 veces más rápido que con TIMP-1 y 5.5 veces más rápido que con TIMP-2 ^[11, 47].

MMP-13 posee un rol central en la cascada de activación de las MMPs ^[11]. Así como la MMP-13 es capaz de activar a otras MMPs, esta colagenasa puede ser activada por MMP-2, -14 y -3; y a la vez, proMMP-13 puede autoactivarse por MMP-13 activa ^[4, 11, 42, 43].

La evidencia actual sugiere que MMP-13 podría tener un rol significativo en el inicio y progreso de la reabsorción ósea, así como en la destrucción de tejido periodontal ^[2, 4, 23]. Se postula que MMP-13 sería la responsable de remover las fibras de colágeno no mineralizado de la superficie del hueso, exponiendo de esta manera la matriz ósea mineralizada antes de la reabsorción ósea por los osteoclastos ^[2, 23].

En periodontitis crónica, la expresión de MMP-13 ha sido detectada en epitelio, tejido conectivo y hueso, así como en el FGC de dientes afectados ^[2, 9, 23, 26, 27]. MMP-13 pareciera ser la principal colagenasa expresada por el epitelio del surco gingival, donde podría participar en el crecimiento del epitelio del surco gingival hacia el tejido conjuntivo durante la inflamación de la mucosa ^[9, 27, 44]. Su expresión en las células epiteliales estaría inducida por citoquinas y factores de crecimiento liberados por células inflamatorias ^[44]. El aumento en los niveles de MMP-13 encontrado en estudios de periodontitis crónica, pareciera ser que es para todas sus formas enzimáticas, es decir, para proMMP-13, MMP-13 activa y sus fragmentos ^[10, 23].

Por otro lado, en la patogénesis de la periodontitis periapical hay degradación de varios componentes de la matriz extracelular ^[15], como colágeno, fibronectina, laminina y pequeños proteoglicanos; todos sustratos de la MMP-13 ^[28]. Es por esto que distintas investigaciones han estudiado la presencia de MMP-13 en LPAs y se ha logrado inmunolocalizar su expresión en estas lesiones ^[13, 19, 28]. Otros estudios

han demostrado que células plasmáticas y epiteliales presentes en LPAs expresan MMP-13 ^[13, 14] y han propuesto que esta colagenasa estaría involucrada en la patogénesis de estas lesiones ^[13], participando en la destrucción de matriz periodontal y en la osteólisis durante la PAa ^[4]. Si bien se sabe que tiene un rol significativo en la destrucción ósea característica de granulomas inflamatorios y quistes odontogénicos ^[14], y en la degradación de matriz periodontal, aún no se conocen los mecanismos específicos en los que participa durante la hidrólisis de tejidos blandos y duros ^[10].

Al comparar la expresión de MMP-13 en ambos tipos de LPAs, se ha visto que MMP-13 se expresa en un mayor número de células en granulomas que en quistes ^[28]. Además, se han detectado niveles de MMP-13 significativamente aumentados en LPAs epitelizadas ^[13, 19], por lo que su expresión en FGC de dientes con LPAs se ha asociado a la presencia de tejido epitelial en la patología periapical y al desarrollo de un quiste radicular a partir de un granuloma ^[4], debido a la capacidad de MMP-13 de influenciar tanto la migración de restos epiteliales como la invasión al tejido de granulación ^[13, 19].

MMPs en FGC

El FGC es un transudado que está constituido por elementos derivados del suero, tejido conectivo, epitelio, leucocitos y bacterias de los tejidos periodontales ^[4, 9]. Al establecerse un proceso infeccioso, el FGC pasa de ser un transudado a un exudado inflamatorio, generado por el aumento de permeabilidad de las barreras vasculares y epiteliales ^[9], que acarrea mediadores de inflamación y destrucción tisular de los tejidos periodontales ^[49]. Es por esto que el FGC ha sido objeto de estudio en pacientes con periodontitis, con el fin de identificar potenciales marcadores y productos de destrucción tisular que sirvan como indicadores diagnósticos ^[50] y que puedan ser obtenidos no invasivamente del surco gingival o saco periodontal ^[4, 51].

En este contexto, estudios que han analizado el nivel de colagenasas en FGC han demostrado correlaciones positivas entre la actividad de estas MMPs y

la severidad de la enfermedad periodontal ^[9, 49, 52], por lo que se ha dado especial atención al uso de las colagenasas como marcadores de progresión de la enfermedad periodontal ^[49]. Del total de colagenasas en el FGC de pacientes periodontales, MMP-13 representa el 3-4% ^[9, 26] y ha sido catalogada como un biomarcador específico de destrucción ósea alveolar ^[49].

Recientemente, un estudio analizó por primera vez el FGC como fuente de moléculas liberadas de LPAs y se postuló que los niveles de MMPs en FGC podrían reflejar el estado inflamatorio de los tejidos periapicales ^[4].

HIPÓTESIS

Los niveles de Metaloproteinasa de matriz extracelular-13 (MMP-13) aumentan en lesiones apicales de dientes con periodontitis apical asintomática en comparación con dientes sanos. Estos cambios se reflejan en el fluido gingival crevicular (FGC) de los dientes afectados.

OBJETIVO GENERAL

Comparar y asociar los niveles de Metaloproteinasa de matriz extracelular-13 (MMP-13) en lesiones apicales y fluido gingival crevicular (FGC) de dientes con periodontitis apical asintomática y de dientes sanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar las formas enzimáticas de la MMP-13 asociadas con periodontitis apical asintomática.
2. Determinar los niveles de MMP-13 en homogeneizados de lesiones periapicales de dientes con periodontitis apical asintomática.
3. Comparar los niveles de MMP-13 en FGC proveniente de dientes con periodontitis apical asintomática y de dientes contralaterales sanos.
4. Asociar los niveles de MMP-13 en FGC de dientes con periodontitis apical asintomática y homogeneizados de lesiones periapicales.

MATERIALES Y MÉTODO

El presente estudio se desarrolló en el marco de los proyectos DI 07/02-2 y FONDECYT 1090461 y por tanto cuenta con la aprobación de los respectivos comités de ética y bioseguridad de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y CONICYT. Corresponde a un estudio analítico de casos y controles.

Selección de Pacientes

Se seleccionaron pacientes (n=12) con diagnóstico clínico y radiográfico de PAa y con indicación de exodoncia, en la Clínica de Cirugía de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, previa firma de un consentimiento informado (Anexo 1), que fue explicado y entregado por los investigadores a los participantes del estudio para su lectura y aprobación. El diagnóstico se realizó mediante anamnesis, examen radiográfico y test de diagnóstico pulpar, el que se registró en una ficha elaborada para tal fin (Anexo 2). Los criterios de inclusión para el diagnóstico de PAa fueron: piezas que no respondieran a los test de diagnóstico pulpar (frío probado con cloruro de etilo, calor probado con transpoliisopreno), que a la percusión vertical la respuesta estuviese normal o levemente aumentada, y que al examen radiográfico se observara destrucción ósea apical mayor a 5mm en relación a la pieza en cuestión (imagen radiográfica compatible con granuloma o quiste radicular). Se excluyeron del presente estudio aquellos pacientes que presentaban enfermedades periodontales, que habían recibido medicación de antibióticos, corticoides o de antiinflamatorios en los últimos 3 meses o que presentaban enfermedades sistémicas asociadas con metabolismo óseo.

Obtención de las muestras, elución y homogenización

Fluido gingival crevicular (FGC)

En cada paciente seleccionado, se obtuvieron muestras de FGC proveniente de

dientes con LPA (n=12) y de FGC de dientes sanos contralaterales (n= 12). Para ello, los dientes se aislaron con tómulas de algodón, se secaron suavemente y se introdujo una tira de papel (periopaper™ strips; Oraflow, Plainview, New York, USA) en el surco gingival durante 30 segundos por sitio: mesio-vestibular, medio-vestibular, disto-vestibular, mesio-palatino/lingual, medio-palatino/lingual y disto-palatino/lingual. Las muestras de FGC fueron eluidas desde las tiras por centrifugación utilizando amortiguador de elución NaCl 0,9%, 30 µL por tira, se vortexeó y se dejó a 4°C durante 30 minutos. Luego, los tubos se centrifugaron a 12.000rpm, por 5 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se repitió el procedimiento, rescatando un volumen final de 360 µL aproximadamente. Los eluidos fueron conservados a -80°C hasta la realización del ensayo bioquímico correspondiente.

Biopsias de LPAs

Se obtuvieron biopsias de LPAs [8] de los mismos dientes con PAA a partir de los cuales se obtuvieron las muestras de FGC. Luego de las exodoncias, se separaron las LPAs de los dientes extraídos con curetas y se depositaron en tubos eppendorf. Posteriormente, las muestras de tejido se homogeneizaron en amortiguador de NaCl 0,9% con cóctel de inhibidor de proteasas (Complete, mini, EDTA-free, Roche®) en proporción volumen:peso de 10 µL/mg de tejido, se centrifugaron a 13.000 rpm por 6 minutos a 4°C, se recogieron los sobrenadantes y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de efectuarse los estudios bioquímicos correspondientes [53].

Cuantificación de Proteínas Totales

A cada muestra se le realizó cuantificación de proteínas totales (µg/µL) mediante el método del ácido bisciconítico (Micro BCA™, Pierce®, Rockford, USA) según instrucciones del fabricante.

Immunowestern blot para MMP-13

Con el objetivo de identificar las formas moleculares de la MMP-13 y posteriormente determinar los niveles correspondientes a las proformas y formas activas, alícuotas de eluidos de FGC y homogeneizados de LPAs (30 µg de proteínas totales) se cargaron en geles SDS-PAGE al 10% durante 60min a 150 V^[54], en condiciones desnaturantes reductoras. Las proteínas así separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45µm (Pierce, Rockford, USA), en ciclos de 10, 20, 30, 40 V, 10 minutos cada uno, y a 50 V por 30 minutos. Posteriormente, la membrana fue bloqueada por 1 hora en amortiguador TBS-T (Tris-HCL 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM y Tween 20 al 0,1%) con leche descremada al 5%. Se lavó con amortiguador TBS-T 0,1%, 4 veces por 15 minutos, y se incubó con anticuerpo primario antiMMP-13 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) en dilución de 1:250 con amortiguador TBS-T 0,1% toda la noche a 4°C. Luego la membrana se lavó con amortiguador TBS-T 0,1%, 4 veces durante 15 minutos, y se incubó con anticuerpo secundario (GAMPO, Dako, Glostrup, Denmark) en dilución de 1:10.000 con amortiguador TBS-T 0,1%, durante 1 hora en agitación. Nuevamente, se realizaron 4 lavados de 15 minutos con amortiguador TBS-T 0,1%. Para identificar la reacción positiva, se utilizó el método de quimioluminiscencia (Pierce Biotechnology, Rockford, USA), donde se expuso a películas radiográficas (Kodak, Rochester, New York, USA) y se reveló utilizando los líquidos respectivos. La intensidad de las bandas se midió por análisis densitométrico con el programa Un Scan iT® (Silk Scientific Inc, Orem, Utah, USA).

Análisis de los datos

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del software Stata v10. Los datos se expresaron como promedio ± desviación estándar (DS). Para comparar la expresión de MMP-13 en FGC de dientes enfermos versus FGC de dientes sanos,

se empleó el Test de t pareado o Wilcoxon, mientras que para asociar los niveles de MMP-13, en FGC de dientes enfermos y en homogeneizados de tejido, correlación de Pearson/Spearman, dependiendo si los datos presentaban o no distribución normal. Se consideró significación estadística cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

El grupo de estudio incluyó 12 pacientes, a partir de los cuales se obtuvo una muestra de FGC de diente con LPA, la lesión correspondiente post-exodoncia y una muestra control de FGC de diente sano contralateral. Los sujetos de estudio presentaron una edad promedio de $44,1 \pm 11,4$ años y 5 de ellos correspondieron a mujeres.

Concentración de proteínas totales (CPT)

FGC: La concentración de proteínas totales de las muestras se observan en la Tabla I. No hubo diferencia entre los valores de FGC de dientes sanos y con PAa ($p < 0,05$).

Homogeneizados de LPAs: Las muestras de homogeneizados de lesiones presentaron una concentración de proteínas totales de $1,81 \pm 0,55 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Tabla I: Concentración de proteínas totales de las muestras de FGC.

	FGC PAa	FGC sanos	p
CPT ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (promedio \pm DS)	$0,31 \pm 0,18$	$0,31 \pm 0,13$	$< 0,05$

Identificación de formas enzimáticas de MMP-13

A través de immunowestern blot se observaron las formas enzimáticas correspondientes a la MMP-13: la forma activa se identificó como una banda única de ~ 48 KDa, mientras que la proMMP-13 se identificó como una banda única de ~ 60 KDa, tanto en homogeneizados de LPAs como en FGC de dientes con PAa y de contralaterales sanos (Figura I).

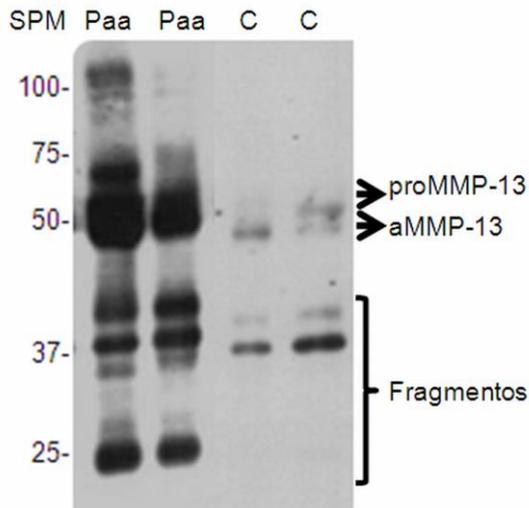


Figura I: Formas enzimáticas de MMP-13 en muestras de FGC de dientes con PAa y controles sanos. Figura representativa que demuestra la expresión proteica de MMP-13 en FGC de enfermos y sanos. Se observan bandas de 60 KDa, que corresponden a la proMMP-13, y de 48 KDa correspondientes a la MMP-13 activa.

Carriles 1 y 2: FGC de dientes con PAa; Carriles 3 y 4: FGC de dientes contralaterales sanos.

Niveles de MMP-13 en FGC y homogeneizados de LPAs

FGC: El análisis densitométrico de las bandas correspondientes a la proforma y forma activa de la MMP-13 determinó aumentos significativos de ambas formas enzimáticas de la MMP-13 en FGC de dientes con PAa en relación con FGC de dientes sanos ($p < 0,0001$) (Figura II).

Homogeneizados de LPAs: En lesiones periapicales, el promedio de los niveles de proMMP-13 correspondió a 8805.5 ± 873 UA/ μ L, así como el promedio de los niveles de MMP-13 activa fue de 5813.4 ± 419.3 UA/ μ L.

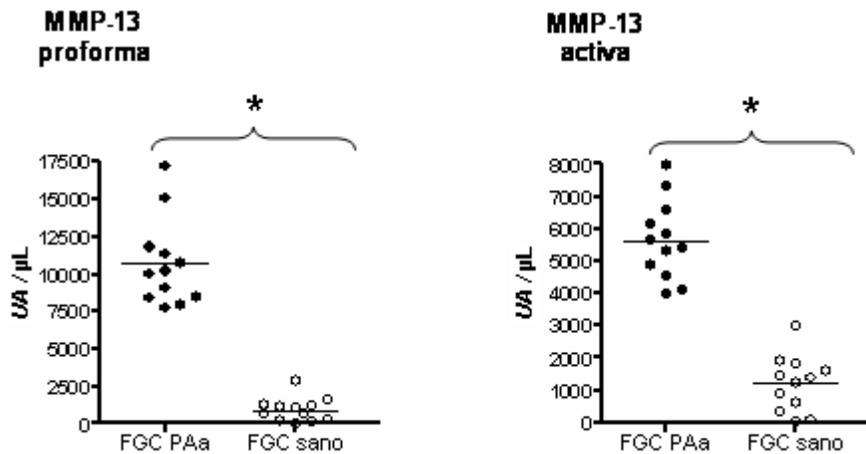


Figura II: Niveles de proformas y forma activa de la MMP-13 en FGC de dientes con PAa y FGC de dientes contralaterales sanos. (* $p < 0,0001$).

Asociación de niveles de MMP-13 entre FGC de dientes con PAa y sus respectivas LPAs

Se encontraron correlaciones positivas ($r = 0,58$; $p = 0,049$) entre los niveles de proMMP-13 en FGC de dientes con PAa y los homogeneizados de biopsias de LPAs (Figura III), mientras que para la forma activa de MMP-13 la correlación no fue significativa ($p = 0,782$).

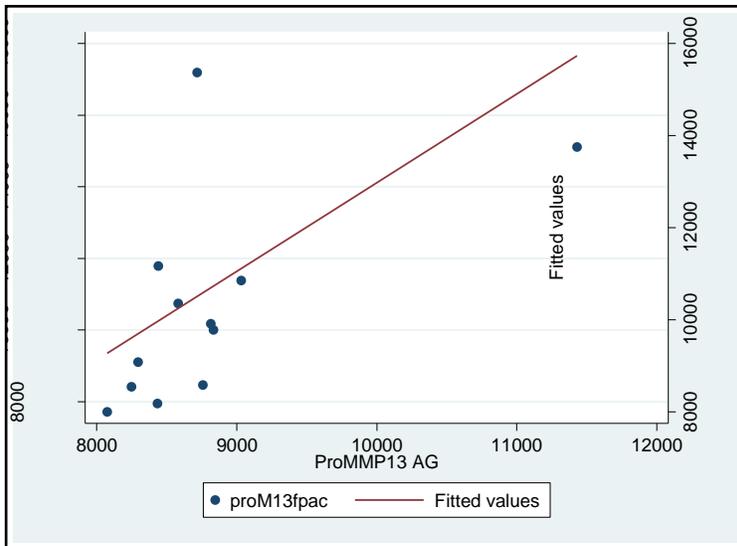


Figura III: Correlación de los niveles de proMMP-13 en FGC de dientes con PAa y homogeneizados de LPAs. Se estableció una correlación positiva en la expresión de MMP-13 en FGC de dientes con PAa y en homogeneizados de biopsias de LPAs, usando los valores obtenidos en el análisis densitométrico del Western blot ($r=0,58$; $p = 0,049$).

DISCUSIÓN

La PAa representa una respuesta inmunoinflamatoria local a la invasión microbiana de la pulpa, que resulta en la inflamación y destrucción del ligamento periodontal y hueso alveolar apical, en ausencia de sintomatología clínica ^[15, 55].

Su patogénesis es muy compleja y los mecanismos de reabsorción ósea permanecen inconclusos hasta hoy ^[6, 34], sin embargo, se sabe que diversos mediadores y factores del hospedero estarían involucrados en la formación de las LPAs, dentro de los cuales MMP-13 desempeñaría un importante rol ^[13].

Los resultados de este estudio soportan la participación de MMP-13 en la patogenia de las LPAs y proveen evidencia preliminar de que el FGC refleja los niveles y/o actividad de MMP-13 en los tejidos periapicales y por tanto, podría constituir una herramienta complementaria a la clínica en el monitoreo del estado de salud/enfermedad periapical durante el diagnóstico y tratamiento endodóntico.

En este trabajo de investigación identificamos la presencia de MMP-13, tanto en su forma zimogénica como en su forma activa, en homogeneizados de LPAs y en FGC de dientes con PAa y de dientes sanos. Estudios previos han demostrado la expresión de MMP-13 en LPAs mediante inmunohistoquímica ^[13, 28], sin embargo, este es el primer estudio donde se describe la presencia de las formas enzimáticas de MMP-13 en FGC de dientes con PAa.

Al comparar los niveles de MMP-13 en FGC de dientes con PAa versus controles, estos fueron significativamente mayores en dientes con PAa. Estas diferencias fueron tanto para proMMP-13 como para MMP-13 activa. Nuestros hallazgos concuerdan con estudios realizados en periodontitis crónica, donde los niveles de MMP-13 en FGC de dientes enfermos han aumentado en relación a los sanos ^[9, 23, 26, 27].

Este es el primer estudio en demostrar la presencia y sobre-expresión proteica

de MMP-13 en FGC de dientes con PAa. El aumento en los niveles de MMP-13 en FGC de dientes con PAa, sugiere fuertemente que MMP-13 estaría involucrada en la génesis y/o progresión de la PAa, posiblemente mediante la destrucción de hueso alveolar en LPAs. De hecho en periodontitis crónica, se ha propuesto como uno de los marcadores específicos de reabsorción ósea alveolar ^[49]. En procesos inflamatorios crónicos, se ha visto que MMP-13 es expresada por osteoblastos adyacentes a los osteoclastos en sitios de reabsorción ósea activa ^[56, 57]. En este contexto, MMP-13 sería la responsable de degradar la capa de colágeno no mineralizado que cubre la superficie del hueso, exponiendo la matriz ósea mineralizada y permitiendo que los osteoclastos puedan adherirse a ella ^[2, 23, 57]. De esta manera, la acción colagenasa y gelatinasa de MMP-13 resultaría en la denudación de la superficie ósea y posterior activación de los osteoclastos ^[57]. En PAa, se ha propuesto que la destrucción ósea característica de las LPAs se debería a la activación de osteoclastos en el área periapical, los cuales liberan proteinasas lisosomales y, de esta forma, degradan la matriz mineralizada del hueso alveolar que rodea el ápice dentario ^[12].

En la actualidad, el diagnóstico, pronóstico, evaluación y control post-tratamiento de las LPAs, se basan fundamentalmente en el análisis radiográfico ^[5, 58], siendo la reabsorción ósea en el área periapical el principal indicador de progreso o reparación de estas lesiones ^[5]. Estudios recientes han demostrado que técnicas como el ultrasonido y la tomografía computarizada Cone-beam permiten hacer el diagnóstico diferencial entre granulomas y quistes, pero en la práctica, la biopsia y su análisis anatomopatológico son la herramienta diagnóstica de rutina para tal efecto ^[38]. Lamentablemente, podrían pasar meses o incluso años antes de detectar cambios en la densidad ósea con la radiografía ^[51], y la biopsia por su parte, se obtiene luego de la exodoncia del diente o bien mediante cirugía periapical ^[8]. En este contexto, sería interesante contar con métodos diagnósticos más sensibles y menos invasivos, que permitan monitorear la presencia y evolución de las LPAs, antes y después del tratamiento endodóntico o quirúrgico.

La muestra de FGC puede obtenerse del surco gingival o saco periodontal de manera fácil y no invasiva, contiene una gran variedad de mediadores que reflejan el estado metabólico de los tejidos periodontales y es una importante fuente de factores posiblemente asociados a la actividad osteoclástica [51]. Un estudio reciente, analizó por primera vez el FGC como fuente de moléculas liberadas de la patología periapical y detectó niveles aumentados de MMP-9 y MMP-2 en FGC de dientes con LPAs [4]. De modo similar, en el presente estudio hemos encontrado niveles significativamente elevados de MMP-13, tanto en su proforma como en la forma activa, en FGC de dientes con PAa en comparación con controles. Por consiguiente, la expresión de MMP-13 en FGC podría servir como un marcador de progresión de las LPAs en dientes con PAa y podría complementar la práctica clínica en la evaluación de la respuesta al tratamiento endodóntico.

Adicionalmente, en este trabajo encontramos una correlación positiva entre los niveles de proMMP-13 en FGC y en homogeneizados de LPAs. Esto sugiere que la principal fuente de MMP-13 en el FGC de dientes con PAa correspondería a la LPA respectiva y por tanto estos resultados contribuyen a evidenciar que el FGC podría reflejar el estado de salud o enfermedad de los tejidos periapicales en dientes con PAa. Esta colagenasa podría representar un potencial biomarcador diagnóstico de PAa y su expresión en FGC podría ayudar en el futuro desarrollo de nuevas tecnologías y métodos diagnósticos y de seguimiento de LPAs.

Este es el primer estudio donde se relacionan los niveles de MMP-13 en FGC de dientes con PAa y en homogeneizados de LPAs. Sin embargo, la correlación entre los niveles de MMP-13 activa en FGC de dientes con PAa y aquellos en homogeneizados de LPAs no fue significativa. Esto podría explicarse por la rápida degradación que sufre la MMP-13 después de activarse y ejercer su acción. La forma activa de MMP-13 es muy inestable y se ha visto que a 37°C se degrada en 2 fragmentos debido a la hidrólisis autoproteolítica del enlace peptídico Ser²⁴⁵-Leu²⁴⁶, separándose el dominio c-terminal del dominio catalítico. Este último dominio,

sufre luego una segunda fragmentación autoproteolítica, con lo que la enzima pierde sus propiedades catalíticas ^[48]. Por otro lado, la inhibición de MMP-13 activa por parte de los TIMPs en FGC también podría explicar este hallazgo.

Debido a que este trabajo de investigación corresponde al primer estudio desarrollado en MMP-13 y sus niveles en el FGC de la PAa, se sugiere complementar estos resultados con nuevos estudios, de modo de caracterizar la expresión de MMP-13 y de otros mediadores inflamatorios en FGC, sus roles en la patogénesis de la PAa y determinar la utilidad del FGC en el estudio de la patología periapical.

CONCLUSIONES

1. MMP-13 se expresa en homogeneizados de LPAs y en FGC de dientes con PAa tanto en su forma zimogénica como en su forma activa.
2. Los niveles de MMP-13 en FGC de dientes con PAa, tanto para proMMP-13 como para MMP-13 activa, son significativamente mayores que en FGC de dientes sanos, sugiriendo fuertemente que MMP-13 participaría en la génesis y/o progresión de la PAa, probablemente contribuyendo en el proceso de destrucción ósea alveolar en LPAs.
3. Existe una correlación positiva entre los niveles de proMMP-13 en FGC de dientes con PAa y en las LPAs respectivas, indicando que los niveles de MMP-13 en el FGC reflejarían los niveles de MMP-13 en la LPA.
4. El FGC podría ser una herramienta útil en el estudio de la PAa, ya que reflejaría los cambios en el estado de salud o enfermedad de los tejidos periapicales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nair, P.N., *Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures*. Crit Rev Oral Biol Med, 2004. **15**(6): p. 348-81.
2. Hernandez, M., et al., *Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity*. J Periodontol, 2006. **77**(11): p. 1863-70.
3. Corotti, M.V., et al., *Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development*. Arch Oral Biol, 2009. **54**(8): p. 764-71.
4. Belmar, M.J., et al., *Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2008. **105**(6): p. 801-6.
5. Metzger, Z., *Macrophages in periapical lesions*. Endod Dent Traumatol, 2000. **16**(1): p. 1-8.
6. Vernal, R., et al., *Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients*. J Periodontol, 2004. **75**(12): p. 1586-91.
7. Vernal, R., et al., *RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction*. Oral Dis, 2006. **12**(3): p. 283-9.
8. Radics, T., et al., *Interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in apical periodontitis: correlation with clinical and histologic findings of the involved teeth*. Oral Microbiol Immunol, 2003. **18**(1): p. 9-13.
9. Hernandez, M., et al., *MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis*. J Clin Periodontol, 2007. **34**(9): p. 729-35.
10. Hernandez Rios, M., et al., *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**(12): p. 1011-7.
11. Leeman, M.F., S. Curran, and G.I. Murray, *The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2002. **37**(3): p. 149-66.
12. Marton, I.J. and C. Kiss, *Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis*. Oral Microbiol Immunol, 2000. **15**(3): p. 139-50.
13. Leonardi, R., R. Caltabiano, and C. Loreto, *Collagenase-3 (MMP-13) is expressed in periapical lesions: an immunohistochemical study*. Int Endod J, 2005. **38**(5): p. 297-301.
14. Wahlgren, J., et al., *Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions*. J Pathol, 2001. **194**(2): p. 217-24.
15. Paula-Silva, F.W., L.A. da Silva, and Y.L. Kapila, *Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment*. J Endod. **36**(2): p. 231-7.
16. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 562-73.
17. Gapski, R., et al., *Systemic MMP inhibition for periodontal wound repair: results of a multi-centre randomized-controlled clinical*

- trial. *J Clin Periodontol*, 2009. **36**(2): p. 149-56.
18. Shin, S.J., et al., *Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions*. *J Endod*, 2002. **28**(4): p. 313-5.
 19. Carneiro, E., et al., *Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009. **107**(1): p. 127-32.
 20. Lin, S.K., et al., *Immunolocalization of interstitial collagenase (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in radicular cysts*. *J Oral Pathol Med*, 1997. **26**(10): p. 458-63.
 21. Wahlgren, J., et al., *Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates*. *Int Endod J*, 2002. **35**(11): p. 897-904.
 22. Buzoglu, H.D., et al., *The zymographic evaluation of gelatinase (MMP-2 and -9) levels in acute and chronic periapical abscesses*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009. **108**(5): p. e121-6.
 23. Ilgenli, T., et al., *Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-13 levels and molecular forms in various types of periodontal diseases*. *Oral Dis*, 2006. **12**(6): p. 573-9.
 24. Martel-Pelletier, J. and J.P. Pelletier, *Wanted--the collagenase responsible for the destruction of the collagen network in human cartilage!* *Br J Rheumatol*, 1996. **35**(9): p. 818-20.
 25. Ma, J., et al., *Collagenases in different categories of peri-implant vertical bone loss*. *J Dent Res*, 2000. **79**(11): p. 1870-3.
 26. Golub, L.M., et al., *A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis*. *Inflamm Res*, 1997. **46**(8): p. 310-9.
 27. Tervahartiala, T., et al., *The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis*. *J Dent Res*, 2000. **79**(12): p. 1969-77.
 28. de Paula-Silva, F.W., et al., *High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas*. *J Endod*, 2009. **35**(9): p. 1234-42.
 29. Alfano, M.C., *The origin of gingival fluid*. *J Theor Biol*, 1974. **47**(1): p. 127-36.
 30. Tjaderhane, L., et al., *The effect of chemical inhibition of matrix metalloproteinases on the size of experimentally induced apical periodontitis*. *Int Endod J*, 2007. **40**(4): p. 282-9.
 31. Silva, T.A., et al., *Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases*. *Oral Microbiol Immunol*, 2005. **20**(5): p. 310-6.
 32. Silva, T.A., et al., *Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease*. *J Dent Res*, 2007. **86**(4): p. 306-19.
 33. Stashenko, P., R. Teles, and R. D'Souza, *Periapical inflammatory responses and their modulation*. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1998. **9**(4): p. 498-521.
 34. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis*. *Braz Dent J*, 2007. **18**(4): p. 267-80.
 35. Sato, Y., et al., *Sonic extracts from a bacterium related to periapical disease activate gelatinase A and inactivate tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2*. *Int Endod J*, 2009. **42**(12): p. 1104-11.

36. Nair, P.N., *Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response*. *Periodontol* 2000, 1997. **13**: p. 121-48.
37. Stashenko, P., S.M. Yu, and C.Y. Wang, *Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections*. *J Endod*, 1992. **18**(9): p. 422-6.
38. Lin, L.M., G.T. Huang, and P.A. Rosenberg, *Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing*. *J Endod*, 2007. **33**(8): p. 908-16.
39. Sorsa, T., L. Tjaderhane, and T. Salo, *Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases*. *Oral Dis*, 2004. **10**(6): p. 311-8.
40. McCawley, L.J. and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!* *Curr Opin Cell Biol*, 2001. **13**(5): p. 534-40.
41. Folgueras, A.R., et al., *Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies*. *Int J Dev Biol*, 2004. **48**(5-6): p. 411-24.
42. Palosaari, H., et al., *Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue*. *Eur J Oral Sci*, 2003. **111**(2): p. 117-27.
43. Knauper, V., et al., *Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(29): p. 17124-31.
44. Uitto, V.J., et al., *Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation*. *Am J Pathol*, 1998. **152**(6): p. 1489-99.
45. Pozo, P., et al., *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.
46. Verstappen, J. and J.W. Von den Hoff, *Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease*. *J Dent Res*, 2006. **85**(12): p. 1074-84.
47. Knauper, V., et al., *Biochemical characterization of human collagenase-3*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(3): p. 1544-50.
48. Knauper, V., et al., *The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(12): p. 7608-16.
49. Kinney, J.S., C.A. Ramseier, and W.V. Giannobile, *Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1098**: p. 230-51.
50. Mogi, M. and J. Ootogoto, *Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis*. *Arch Oral Biol*, 2007. **52**(9): p. 894-8.
51. McCauley, L.K. and R.M. Nohutcu, *Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy*. *J Periodontol*, 2002. **73**(11): p. 1377-91.
52. Golub, L.M., et al., *Some characteristics of collagenase activity in gingival crevicular fluid and its relationship to gingival diseases in humans*. *J Dent Res*, 1976. **55**(6): p. 1049-57.
53. Segulier, S., et al., *Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in*

- human gingival tissue?* J Periodontol, 2001. **72**(10): p. 1398-406.
54. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
55. 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.
56. Pirhan, D., et al., *MMP-13 promoter polymorphisms in patients with chronic periodontitis: effects on GCF MMP-13 levels and outcome of periodontal therapy.* J Clin Periodontol, 2009. **36**(6): p. 474-81.
57. Rifas, L. and S. Arackal, *T cells regulate the expression of matrix metalloproteinase in human osteoblasts via a dual mitogen-activated protein kinase mechanism.* Arthritis Rheum, 2003. **48**(4): p. 993-1001.
58. Tikku, A.P., et al., *Use of ultrasound, color Doppler imaging and radiography to monitor periapical healing after endodontic surgery.* J Oral Sci. **52**(3): p. 411-6.

ANEXO 1

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Trabajo de Investigación: “Expresión de Metaloproteinasa-13 (MMP-13) en dientes con periodontitis apical asintomática”.

Investigador responsable: Marcela Hernández Ríos

Antecedentes Generales

Las lesiones periapicales de origen endodóntico se producen una vez que las bacterias y/o sus productos han alcanzado el área apical del diente provocando una inflamación del tejido perirradicular, conocida como Periodontitis apical, que genera destrucción del hueso circundante. El tratamiento indicado para estas lesiones es el tratamiento endodóntico para el diente en cuestión, permitiendo eliminar la infección y evitar las complicaciones de estas patologías y/o la pérdida de la pieza dentaria. El propósito del presente estudio es analizar la presencia de mediadores inflamatorios responsables de la destrucción ósea en estos tipos de lesiones.

Este formulario será explicado por el investigador, se entregará a los participantes para su lectura en casa y será firmado en dos ejemplares, uno de los cuales será guardado por el investigador y el otro por el paciente.

Procedimiento

A los sujetos seleccionados para el presente estudio se les efectuará un examen clínico y radiográfico de la pieza dentaria afectada por Periodontitis Apical Crónica, serán sometidos a tratamiento endodóntico de la pieza, durante el cual se les tomará una muestra del contenido del conducto, así como de fluido gingival crevicular (FGC) con tiras de papel absorbente, en forma previa y después del tratamiento endodóntico. Esta muestra no se realiza normalmente a los pacientes, pero es completamente inocua y sin ninguna implicancia para el tratamiento. Una vez analizadas, las muestras serán descartadas.

En los pacientes que presenten indicación de extracción dentaria, las piezas extraídas serán sometidas a estudio anatomopatológico, estudio que se indica como procedimiento de rutina para cualquier lesión extirpada.

Los datos personales e identificación de los sujetos participantes serán confidenciales. En caso de manifestar interés en los resultados de los análisis efectuados, los interesados pueden acceder a esta información solicitándola al investigador responsable.

Los sujetos participantes pueden retirarse del estudio en cualquier momento, en caso de que lo estimen conveniente.

Ventajas

Como ventajas de participar en el presente estudio, a todos los pacientes

participantes del mismo se les obsequiarán elementos de higiene dental, ya sea cepillos, seda dental y limpiadores de espacios interproximales. Además, el estudio anátomo patológico de rutina se realizará sin costo económico en los casos de extirpación de lesiones y así como el diagnóstico molecular de las muestras de fluidos.

Declaro

Haber comprendido las explicaciones que se me han facilitado, en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo me ha permitido realizar todas las observaciones y preguntas necesarias, resolviéndome todas las dudas que he planteado. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto para participar en el presente Proyecto de Investigación.

Identificación Paciente

Identificación del Investigador

Nombre:.....

Nombre:.....

Rut:.....

Rut:.....

Teléfono:.....

Firma:.....

Firma:.....

Fecha:.....

ANEXO 2

FICHA CLÍNICA

Nombre:.....Edad:.....

Anamnesis:

Enfermedades Generales.....

Tratamientos Médicos Actuales:.....

Diente a Tratar:.....

Síntomas Subjetivos:

1. Dolor (ausente/presente):.....
2. Intensidad (leve/moderado/severo):.....
3. Duración (momentáneo/persistente):.....
4. Aparición (espontáneo/requiere estimulación):.....
5. Localización (localizado/difuso):.....
6. Provocado (frío/calor/presión/masticación):.....
7. Sensación de diente elongado:.....

Examen Clínico Extraoral:

1. Aumento de Volumen:.....
2. Adenopatía:.....
3. Fístula:.....
4. Otros:.....

Síntomas Objetivos:

1. Exposición pulpar:.....
2. Cambio de color coronario:.....
3. Caries/obturaciones/fracturas:.....
4. Movilidad:.....
5. Oclusión del diente (normal/inoclusión/trauma oclusal):.....

Región Vestibular:

1. Cambio de coloración:.....
2. Dolor a la palpación:.....
3. Aumento de volumen (localizado/difuso/duro/blando):.....
4. Fístula (activa/inactiva):.....

Examen Radiológico:

1. Reabsorción ósea marginal
(vertical/horizontal/discreta/moderada/avanzada).....
2. Línea Periodontal Apical
(normal/engrosada/ausente).....
3. Área periapical
(normal/Osteoesclerosis/radiolucidez):.....
4. Límites área Radiolúcida
(netos/difusos/Corticalizados):.....

5. Tamaño Área Radiolúcida (vertical/horizontal
mms):.....

Test Diagnóstico:

- 1. Frío (normal/aumentada/disminuida/no responde)
(leve/moderada/severa):.....
- 2. Calor (normal/aumentada/disminuida/no responde)
(leve/moderada/severa):.....
- 3. Percusión
(normal/aumentada):.....

DIAGNÓSTICO:.....
Fecha:.....
Examinador:.....