

# Efecto del Tratamiento Periodontal no Quirúrgico en los Niveles de MMP-2 y TIMP-2 en Periodontitis Crónica

## Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment in the Levels of MMP-2 and TIMP-2 in Chronic Periodontitis

Dutzan N<sup>1</sup>, Hernández M<sup>1,2</sup>, Pozo P<sup>3</sup>, Rivera O<sup>1</sup>, Oyarzún A<sup>4</sup>, Dezerega A<sup>1</sup>

### RESUMEN

La MMP-2 es una gelatinasa envuelta en la degradación de la matriz extracelular ya sea directamente por sus efectos degradativos o por la capacidad de procesar sustratos bioactivos. El **objetivo** de este estudio fue determinar el efecto del tratamiento periodontal no quirúrgico en los niveles de MMP-2 y TIMP-2 en el fluido gingival crevicular (FGC) de sitios con periodontitis crónica. **Materiales y Métodos:** Se estudiaron sitios de individuos con periodontitis crónica los cuales fueron seguidos hasta completar el tratamiento periodontal no quirúrgico. Se obtuvieron biopsias (pre-tratamiento) y FGC (pre y post tratamiento) de sitios con periodontitis crónica y de sitios sanos. Se observó la expresión de MMP-2 y TIMP-2 en tejidos gingivales enfermos y sanos mediante inmunohistoquímica y se determinaron sus niveles mediante la técnica ELISA. **Resultados:** Observamos presencia de MMP-2 y TIMP-2 en biopsias de sitios con periodontitis (pre-tratamiento) y sitios sanos. Los niveles de MMP-2 fueron mayores en el FGC de individuos con periodontitis en comparación a individuos sanos. Los niveles de MMP-2 disminuyeron en los sitios afectados luego de realizado el tratamiento periodontal no quirúrgico. No encontramos diferencias significativas en los niveles de TIMP-2 al comparar sitios antes o después del tratamiento. **Conclusión:** La MMP-2 podría tener un rol dentro de los fenómenos de destrucción tisular que caracteriza a la periodontitis crónica. El tratamiento periodontal no quirúrgico disminuye los niveles de MMP-2 en sitios con periodontitis crónica.

**Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 2(2); 68-72, 2009.**

**Palabras clave:** MMP-2, TIMP-2, fluido gingival crevicular, tratamiento periodontal.

### ABSTRACT

Matrix metalloproteinase (MMP)-2 is a gelatinase involved in extracellular matrix degradation either by its direct degradative effects or by processing bioactive substrates. The **aim** of this study was to determine the effect of conventional treatment in the levels of MMP-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 in gingival crevicular fluid (GCF) of chronic periodontitis patients. **Materials and Methods:** In this study chronic periodontitis patients with moderate to severe disease were followed until they complete the non-surgical periodontal therapy. Gingival biopsies were obtained from periodontitis (pre-treatment) and healthy sites. GCF samples were obtained from periodontitis (pre and post treatment) and healthy sites. MMP-2 and TIMP-2 detection were carried out by immunohistochemistry and levels determination by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** We observed the expression of MMP-2 and TIMP-2 in gingival biopsies from periodontitis (pre-treatment) and healthy sites. The levels of MMP-2 were higher in GCF of disease sites in relation to healthy sites and lower post-treatment sites in comparison with pre-treatment sites. There were no significant differences in the levels of TIMP-2 before or after nonsurgical periodontal treatment. **Conclusion:** MMP-2 could play a role in tissue destruction a characteristic of chronic periodontitis. Nonsurgical periodontal treatment decrease the levels of MMP-2 in sites with chronic periodontitis.

**Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 2(2); 68-72, 2009.**

**Key words:** MMP-2, TIMP-2, gingival crevicular fluid, periodontal treatment.

### INTRODUCCIÓN

La Enfermedades Periodontales comprenden un grupo de condiciones, causadas por infección bacteriana, que afectan los tejidos de soporte del diente<sup>(1)</sup>, y que está caracterizada por un denso infiltrado inflamatorio asociado con pérdida de hueso alveolar e inserción de tejido conectivo, cuya consecuencia final puede ser la pérdida dentaria<sup>(2)</sup>. Se cree que la pérdida de tejido durante la periodontitis es el resultado de la activación de células del hospedero generada tanto por antígenos bacterianos como por mediadores inflamatorios producidos localmente como respuesta frente a dichos antígenos<sup>(3)</sup>. Estos mediadores gatillarían la reabsorción de hueso alveolar y la expresión de proteasas que degradan matriz extracelular (MEC), lo que se traduce en destrucción tisular. Dichos mediadores corresponden en su mayoría a metabolitos del ácido araquidónico, citoquinas y enzimas. Es reconocido que durante la periodontitis activa, la degradación de tejido, principalmente colágeno, se debe en parte a Metaloproteinasas de Matriz extracelular (MMPs) expresadas *in situ* por células inflamatorias y residentes<sup>(4)</sup>. A nivel extracelular la actividad de estas enzimas está determinada por mecanismos de activación de sus proformas y por inhibición a través de Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas (TIMPs). De esta forma

el balance entre MMPs y TIMPs es de central importancia para la degradación de tejido conectivo durante condiciones tanto fisiológicas como patológicas<sup>(5)</sup>.

En periodontitis crónica se ha observado la presencia de MMPs -1, -2, -3, -7, -8, -9 y -13, mientras que en encía sana sólo la pro forma de MMP-2. La MMP-2 es producida por fibroblastos gingivales e hidroliza preferentemente gelatina y colágeno tipo IV, actuando también sobre colágeno tipo I triple hélice, proteoglicanos de cartílago y elastina, IL-1 $\beta$ , MCP-3, decorina y laminina-5<sup>(4,5,6,7)</sup>. El principal inhibidor de la MMP-2 es TIMP-2<sup>(8,9)</sup>.

Si bien la variación que experimentan los niveles de MMP-2 y TIMP-2 antes y posterior al tratamiento periodontal no quirúrgico no ha sido descrita, estudios demuestran que este tratamiento disminuye significativamente los niveles de MMP-1 y MMP-3 aumentando por otro lado los niveles de TIMP-1 en el FGC de individuos con periodontitis crónica<sup>(10,11)</sup>.

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del tratamiento periodontal no quirúrgico en los niveles de MMP-2 y TIMP-2 presentes en FGC de pacientes con diagnóstico de Periodontitis Crónica.

1. Laboratorio de Biología Periodontal, Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

2. Departamento de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

3. Departamento de Odontología, Facultad de Medicina, Universidad de Antofagasta. Chile.

4. Unidad de Biología Oral, Facultad de Odontología, Universidad Finis Terrae. Chile.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección de pacientes y de sujetos sanos

Se seleccionaron 30 pacientes de edad  $\geq 35$  años, con diagnóstico de periodontitis crónica, de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión:

1. Presencia de un mínimo de 14 dientes, excluyendo los terceros molares, de los cuales al menos 6 sean dientes posteriores.
2. Severidad de la enfermedad de moderada a avanzada: al menos 5-6 dientes con bolsas periodontales  $\geq 5$  mm, pérdida de inserción  $\geq 3$  mm, y con pérdida de hueso horizontal determinada en una radiografía.
3. No haber recibido nunca tratamiento periodontal.
4. No presentar enfermedad sistémica que pueda afectar la periodontitis y/o que requiera premedicación médica.
5. No haber recibido medicación de antibióticos o de antiinflamatorios en los últimos 3 meses.

Además se seleccionaron 10 sujetos voluntarios sin enfermedad periodontal, como grupo control.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, se explicó a todos los pacientes y se obtuvo consentimiento informado de cada uno de los participantes.

Todos los pacientes fueron sometidos a tratamiento periodontal. Se realizó un control clínico a las 6 semanas post-tratamiento periodontal no quirúrgico.

### Mediciones clínicas

Se tomaron mediciones replicadas del nivel de inserción y de la profundidad de la bolsa periodontal en 6 sitios por diente, por un investigador calibrado ( $\kappa=0,85$ ). Mediciones dicotómicas de placa supragingival y de sangramiento al sondaje también fueron realizadas en los 6 sitios por diente. Las mediciones del nivel de inserción y de la profundidad de la bolsa se tomaron con una sonda milimetrada modelo Universidad Carolina del Norte (UNC15) (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA).

### Colección de fluido gingival crevicular (FGC) y obtención de biopsia de tejido

**a) Recolección de FGC.** Para la recolección de FGC, se procedió a aislar los dientes con rollos de algodón, se secó cuidadosamente el sitio gingival con una jeringa de aire. El FGC se recolectó con tiras de papel Periopaper® (ProFlow, Amityville, New York), luego las tiras de Periopaper® se introdujeron dentro de un tubo eppendorf estéril y guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

En los pacientes con periodontitis crónica se tomaron muestras de FGC de bolsas  $>5\text{mm}$  (3 tiras por sitio), al inicio del estudio ( $n=30$ ), y luego de 6 semanas del tratamiento. Como controles se usaron muestras de FGC de sujetos sanos ( $n=10$ ), las que se tomaron en el surco mesiobucal de éstos dientes.

**b) Elución del fluido gingival crevicular.** Después de recolectado el FGC, éste se extrajo desde las tiras de papel en un tubo eppendorff (Eppendorf, Hamburg, Germany) con 50  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato salino con 0.05% de Tween-20 (PBS-T) por tira de Periopaper®, se incubó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos y luego se centrifugó a 12500 rpm durante 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$  (Hermle LaborTechnic, Germany) repitiendo el procedimiento tres veces. El fluido obtenido de cada muestra se mantuvo a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

**c) Cuantificación de proteínas en fluido gingival crevicular.** La cantidad de proteínas totales del FGC fue cuantificada con el método del ácido bicinonítico (Micro BCA™, Pierce®, Rockford, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cantidad de proteínas totales se expresó en microgramos por mililitro a través de una curva estándar obtenida con albúmina sérica bovina.

**d) Colección de tejido conectivo gingival.** Se tomaron biopsias de tejido conectivo gingival de sitios periodontales con bolsas de más de 5 mm ( $n=10$ ), para ello se procedió a realizar una incisión con una hoja de bisturí N°15 a 1-2 mm desde el margen gingival, dirigida hacia la cresta

alveolar, siguiendo el eje mayor del diente, de modo que la biopsia contenga epitelio y tejido conectivo. Una vez tomada la biopsia se lavó con NaCl 0,15 M estéril, para eliminar detritus y coágulos sanguíneos. Las biopsias obtenidas se transportaron en Formaldehído 4% ( $4^{\circ}\text{C}$  durante la noche) se fijaron en parafina y luego se procesaron para realizar inmunohistoquímica. Como control se tomaron biopsias de tejido conectivo gingival de sujetos periodontalmente sanos que fueron derivados para realizar cirugía de restitución ancho biológico por indicación protésica ( $n=5$ ).

### Detección de MMP-2 y TIMP-2 en tejido gingival

**a) Inmunohistoquímica.** Se obtuvieron secciones de tejido de 7  $\mu\text{m}$  de espesor, las que luego de ser desparafinadas se sometieron a digestión con Tripsina al 0,1% a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos, luego se sometieron a bloqueo de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0,3% en metanol durante 30 minutos, y tras lavar se bloquearon los sitios inespecíficos con suero bovino fetal al 3%, se lavaron nuevamente y se incubaron con los respectivos anticuerpos monoclonales anti-Human MMP-2 y TIMP-2 (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN) en las diluciones recomendadas por los fabricantes, durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Tras lavar, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. La reacción se visualizó con la adición de tetracloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), dando una coloración marrón. Finalmente se realizó una contra-tinción con Hematoxilina de Carazzi, se procedió a la deshidratación y montaje de los especímenes. Los controles negativos se realizaron con el mismo protocolo, exceptuando la adición de anticuerpo primario.

### Niveles de MMP-2 y TIMP-2 en FGC

**a) Cuantificación de MMP-2 y TIMP-2.** Alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  de cada muestra de FGC fueron usadas para determinar el nivel de MMP-2 y de TIMP-2, a través de la técnica de ELISA, de acuerdo con las indicaciones del fabricante (R&D systems®). Brevemente se cargaron estándares y muestras en pocillos precubiertos con los anticuerpos anti-MMP-2 y anti-TIMP-2, respectivamente, de modo que las moléculas en estudio presentes en la muestra se unieran al anticuerpo primario, para después lavar aquellos componentes de la muestra no unidos. Luego los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron mediante un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa y se visualizaron mediante la adición de un sustrato colorimétrico. Las concentraciones de las moléculas en estudio se obtuvieron a partir de una curva estándar mediante la lectura en espectrofotómetro a 450 nm. Los resultados se expresaron en ng/sitio para MMP-2 y TIMP-2.

### Análisis de los datos

Se usó el paquete estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. San Diego, CA). Todas las variables fueron analizadas calculando el promedio  $\pm$  desviación estándar. Debido a que la distribución de los datos fue normal, para comparar los niveles de MMP-2 y TIMP-2 entre sitios enfermos antes y después del tratamiento se utilizó el T test pareado. Para comparar los niveles entre sitios con periodontitis y sanos se utilizó el T test no pareado, en ambos test se utilizó un nivel de significancia  $p<0,05$ .

## RESULTADOS

### Características Clínicas de la muestra

Después de un examen inicial de 80 pacientes con periodontitis, se seleccionaron aquellos pacientes que cumplían con los criterios de inclusión y exclusión. De esta forma el grupo experimental quedó constituido por 30 pacientes (18 mujeres y 12 hombres, 37 a 67 años de edad, con un promedio de 48 años). El grupo control lo constituyeron 10 sujetos (6 mujeres y 4 hombres, con edades entre 37 y 54 años, con un promedio de 45 años). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en edad o género entre los grupos experimental y control. Las características clínicas de los pacientes y controles se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características Clínicas de Pacientes y Controles (promedio ± DS).

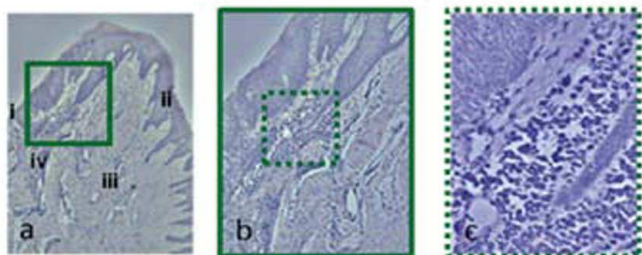
	Periodontitis N=30	Sanos N=10
Edad	48,47 ±8,95	45,13±5,89
Género	18	6
PS	4,56 ±0,56*	1,42 ±0,39*
NIC	6,31 ± 0,72§	0,56 ±0,24§
PB	100£	17,44£
BOP	100¢	7,92¢

Edad (años). Género (número de mujeres). PS: Profundidad de sondaje (mm).  
 NIC: Nivel de inserción clínico (mm). PB: Placa bacteriana (% de sitios).  
 BOP: Sangramiento al sondaje (% de sitios).  
 \*, §, £, ¢:  $p < 0.05$  (Test T no Pareado).

Como se observa en la Tabla 1, tanto la profundidad al sondaje como el nivel de inserción clínico, placa bacteriana y sangramiento al sondaje varían significativamente entre pacientes con periodontitis y controles.

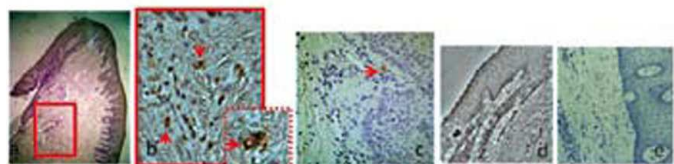
### Análisis Inmunoquímico de la expresión de MMP-2 y TIMP-2 en tejido gingival

La Figura 1 muestra una biopsia de tejido gingival de un paciente con periodontitis. En ella es posible distinguir topográficamente el epitelio bucal (ii), el epitelio del saco (i) y el infiltrado inflamatorio subyacente (iv), característico de la periodontitis.



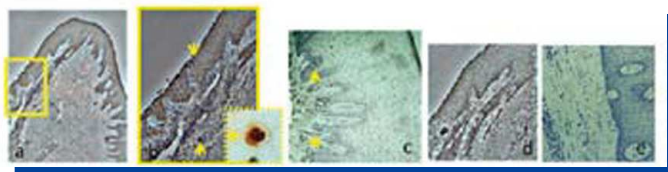
**Figura 1.** Microfotografía de tejido conectivo gingival de pacientes con periodontitis. Las biopsias se fijaron en Formaldehído al 4%, se embecieron en parafina y se obtuvieron cortes de 7µm que se tiñeron con Giemsa. (a) Se aprecian topográficamente el epitelio del saco (i), el epitelio bucal (ii), y bajo ellos el tejido conectivo (iii) con abundante infiltrado inflamatorio próximo al epitelio del saco (iv) (5x). (b) y (c) Se observa con mayor detalle el infiltrado inflamatorio (10 y 40x respectivamente).

Como se observa en la Figura 2, se demostró la presencia de MMP-2 en tejido conectivo gingival de pacientes con periodontitis (a y b), encontrándose también células positivas para el marcaje de MMP-2 en tejido conectivo gingival de sujetos sanos (2c). La presencia de MMP-2 se asocia principalmente a células con morfología de fibroblastos y a infiltrado inflamatorio. A su vez, la presencia de TIMP-2 se manifiesta tanto en tejido conectivo gingival de sujetos sanos (Figura 3 e), como en tejido de pacientes con periodontitis (Figura 3 a, b y c) asociada principalmente células epiteliales en las capas más profundas del epitelio.



**Figura 2.** Inmunolocalización de MMP-2 en tejido conectivo gingival de pacientes y controles. Las biopsias se fijaron en Formaldehído al 4%, se embecieron en parafina y se obtuvieron cortes de 7µm, los que se digirieron con tripsina, se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno-metanol, se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA y se incubó con anticuerpo anti MMP-2 durante la noche. Tras lavar, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. La reacción se visualizó DAB, dando una coloración marrón. Finalmente se realizó una contratinción con Hematoxilina de Carazzi. Para los controles negativos el protocolo fue el mismo sólo que no se incubó con el anticuerpo primario. Las microfotografías muestran la expresión de MMP-2 en

tejido conectivo gingival de pacientes (a y b) y controles (c), (d y e controles negativos de pacientes y sanos respectivamente). Flechas indican células positivas. Se observa expresión de MMP-2 a nivel epitelial en pacientes (a) y en tejido conjuntivo, asociado principalmente a fibroblastos y también a células del infiltrado inflamatorio (b). En sanos se observa menor expresión de MMP-2 y sólo en tejido conjuntivo. Magnificación: (a) 5x, (b) y (c) 40x, (d) y (e) 10x.



**Figura 3.** Inmunolocalización de TIMP-2 en tejido conectivo gingival de pacientes y controles. Las biopsias se fijaron en Formaldehído al 4%, se embecieron en parafina y se obtuvieron cortes de 7µm, los que se digirieron con tripsina, se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno-metanol, se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA y se incubó con anticuerpo anti TIMP-2 durante la noche. Tras lavar, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. La reacción se visualizó DAB, dando una coloración marrón. Finalmente se realizó una contratinción con Hematoxilina de Carazzi. Para los controles negativos el protocolo fue el mismo sólo que no se incubó con el anticuerpo primario. Las microfotografías muestran la expresión de TIMP-2 en tejido conectivo gingival de pacientes (a y b) y controles (c), (d y e controles negativos de pacientes y sanos respectivamente). Flechas indican células positivas. Se observa inmunoreacción a tanto en pacientes como en sanos como a nivel epitelial como conjuntivo, donde en enfermos se asocia tanto a fibroblastos como a infiltrado inflamatorio (b). Magnificación: (a) 5x, (b) 10x, (c) 40x, (d) y (e) 10x.

### Concentración de Proteínas totales en FGC

La concentración de proteínas totales obtenida de FGC de pacientes con periodontitis de sitios con bolsas de más de 5 mm fue significativamente mayor que en los sujetos sanos. A su vez, la concentración de proteínas de FGC de las bolsas de más de 5 mms disminuyó significativamente después del tratamiento periodontal (Tabla 2).

**Tabla 2.** Concentración de Proteínas Totales de sitios enfermos antes y después del tratamiento periodontal y sitios sanos (ug/ul, promedio ± DS).

Enfermos N=30	PosTratamiento N=30	Sanos N=10
0,59±0,28¢f	0,36±0,13f	0,18±0,02¢

f:  $p < 0,0001$  (T test Pareado).  
 ¢:  $p < 0,0001$  (T test no Pareado).

### Niveles de MMP-2 y TIMP-2 en FGC

Como se observa en las Tablas 3 y 4, los niveles de MMP-2 resultaron ser significativamente mayores en enfermos pretratamiento que en sanos (0,72±0,39 ng vs. 0,17±0,03 ng,  $p < 0.001$  por sitio y 3,45±1,14 ng/mL vs. 2,62±0,78 ng/mL  $p < 0.001$  al ser normalizados por concentración de proteínas), sin embargo la diferencia no fue significativa al comparar los mismos sitios enfermos después del tratamiento periodontal con sitios sanos (0,23±0,09 ng vs 0,17±0,03 ng  $p > 0,05$  por sitio y 2,11±0,91 ng/mL vs. 2,62±0,78 ng/mL  $p > 0,05$ , normalizado por concentración de proteínas). Se observa también una disminución significativa de los niveles de MMP-2 para los sitios enfermos luego del tratamiento periodontal (0,72±0,39 ng vs 0,23±0,09 ng,  $p = 0,001$  por sitio y 3,45±1,14 ng/mL vs 2,11±0,91 ng/mL  $p = 0,001$  normalizado por concentración de proteínas). Por otro lado no existieron diferencias significativas en los niveles de TIMP-2 al comparar los sitios pre-tratamiento vs post-tratamiento, tanto a nivel de sitio como normalizado por concentración de proteínas (1,43±0,61 ng vs 1,62±0,92 ng  $p > 0,05$ ; 8,10±3,85 ng/mL vs 8,99±5,21 ng/mL) pero si fue significativa al comparar sujetos con periodontitis crónica versus sanos (1,43±0,61 ng vs 0,86±0,19 ng  $p < 0,05$ ; 8,10±3,85 ng/mL vs 15,58±9,32 ng/mL  $p < 0,001$ ).



## DISCUSIÓN

La actividad de las MMP es regulada en múltiples niveles como la expresión génica, la conversión de la pro-enzima a su forma activa y la formación de complejos con inhibidores específicos como los TIMPs<sup>(12)</sup>. La MMP-2 pertenece a la amplia familia de las proteasas dependientes de zinc, las cuales cumplen un importante rol en la degradación de la matriz extracelular. Esta MMP está implicada en numerosos procesos patogénicos como la invasión de tumores y metástasis<sup>(13)</sup>.

Diferentes estudios han demostrado que TIMP-2 es el inhibidor fisiológico de MMP-2. Un aumento en los niveles de TIMP-2 en relación con MMP-2 puede disminuir la actividad de MMP-2 y bloquear su actividad<sup>(8,9)</sup>.

La degradación de tejido que caracteriza a la periodontitis puede deberse en parte a un desbalance entre MMPs y TIMPs. De hecho MMP-1, -2, -3, -4, -8, -9, -13, -14, -25 y -26 como TIMP-1 y -2 han sido detectados tanto en biopsias gingivales como en FGC de pacientes con diversas condiciones periodontales<sup>(4,5,7,14,15)</sup>. La expresión de MMP-2 y TIMP-2 se encuentra regularmente en tejidos periodontales sanos y se supone estaría involucrada en el recambio fisiológico de la matriz extracelular del periodonto o correspondería al resultado de estados inflamatorios subclínicos en los tejidos<sup>(16)</sup>. De hecho las MMPs se expresan en bajos niveles por muchos tipos de tejidos incluso en ausencia de inflamación clínica u otros procesos patológicos<sup>(16)</sup>.

La variación que experimentan los niveles de MMP-2 y TIMP-2 antes y posterior al tratamiento periodontal no ha sido claramente descrita. El presente estudio determinó el efecto del tratamiento periodontal no quirúrgico en los niveles de MMP-2 y TIMP-2, para sitios con periodontitis crónica moderada o severa.

Observamos expresión de MMP-2 y TIMP-2 en tejido conectivo gingival y epitelio proveniente de pacientes con periodontitis y sujetos sanos (Figuras 2 y 3).

Nuestro trabajo concuerda con publicaciones anteriores donde se ha descrito la expresión de MMP-2 en biopsias de tejido gingival<sup>(17)</sup>. Meikle y cols.<sup>(17)</sup> observaron que en tejido conectivo gingival y células de Langerhans en epitelio gingival de pacientes con periodontitis, se expresa significativamente más MMP-2 que sujetos sanos, y su ubicación abarca la zona media del epitelio, como también la capa basal y la vecindad de la membrana basal y que la expresión de TIMP-2 en estas células se observó tanto en condiciones de salud como de enfermedad, cambiando su distribución, de manera tal que durante la periodontitis las células positivas para el marcaje de TIMP-2 se ubicaron en las capas más profundas del epitelio, lo que sugiere que su expresión podría prevenir la migración de estas células hacia el conectivo. A su vez la expresión de MMP-2 podría ser fundamental en la migración hacia el conectivo dada su eficiente actividad contra colágeno IV presente en membranas basales<sup>(16)</sup>. En patologías orales similares a la periodontitis crónica, como es la periodontitis apical crónica, también se ha determinado la presencia de TIMP-2, y de manera similar a la observado en nuestro estudio, donde la expresión de TIMP-2 se localiza tanto a nivel del conjuntivo como del epitelio, se ha visto que TIMP-2 se expresa abundantemente en epitelio de quistes radiculares inflamatorios<sup>(19)</sup>.

La cantidad total de MMP-2 en FGC de pacientes con periodontitis es mayor que en sujetos sanos, disminuyendo luego del tratamiento periodontal (Tabla 3 y 4). Nuestros resultados confirmaron hallazgos de estudios previamente publicados donde se ha observado una expresión significativamente mayor de MMP-2 en pacientes con periodontitis crónica que en sujetos sanos<sup>(16,18)</sup>. Este hallazgo es consistente con el hecho de que la expresión de MMP-2 puede ser inducida por bacterias periodontopatógenas. En el estudio de Zhou & Windsor<sup>(20)</sup>, donde trataron con Pg explantes de fibroblastos gingivales, observaron que la razón proMMP-2/MMP-2 aumentaba en el sobrenadante en comparación con explantes no tratados. Por otro lado, nuestros resultados se contraponen a lo descrito por Goncalvez et al<sup>(6)</sup>, quienes si bien observaron una mayor actividad de MMP-2 y MMP-9 en tejido gingival inflamado, ésta fue casi indetectable en pacientes con periodontitis crónica.

**Tabla 3.** Niveles de MMP2 y TIMP2 de sitios enfermos antes y después del tratamiento periodontal y de sitios sanos (promedio  $\pm$  DS) expresado por sitio.

	Pretratamiento N=30	Postratamiento N=30	Sanos N=10
MMP-2 ng	0,72 $\pm$ 0,39*§	0,23 $\pm$ 0,09*	0,17 $\pm$ 0,03§
TIMP-2 ng	1,43 $\pm$ 0,61¢	1,62 $\pm$ 0,92	0,86 $\pm$ 0,19¢

\*:  $p < 0,0001$  (Test T Pareado). §:  $p < 0,0001$  (Test T no Pareado).

¢:  $p < 0,05$  (Test T no Pareado).

**Tabla 4.** Niveles de MMP2 y TIMP2 de sitios enfermos antes y después del tratamiento periodontal y de sitios sanos, normalizado por concentración de proteínas (promedio  $\pm$  DS).

	Pretratamiento N=20	Postratamiento N=20	Sanos N=10
MMP-2 ng/ml	3,45 $\pm$ 1,14*§	2,11 $\pm$ 0,91*	2,62 $\pm$ 0,78§
TIMP-2 ng/ml	8,10 $\pm$ 3,85¢	8,99 $\pm$ 5,21	15,58 $\pm$ 9,32¢

\*:  $p < 0,0001$  (Test T Pareado). §:  $p < 0,05$  (Test T no Pareado).

¢:  $p < 0,001$  (Test T no Pareado).

Si bien se ha considerado que la expresión de MMP-2 es constitutiva<sup>(21)</sup>, el aumento de sus niveles durante la periodontitis puede deberse a inducción por LPS de patógenos periodontales<sup>(22)</sup> o bien, de mediadores proinflamatorios como IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ <sup>(23)</sup>, ampliamente presentes en periodontitis<sup>(24)</sup>. De hecho está descrito que los fibroblastos sintetizan mayores cantidades de MMP-2 en respuesta a citoquinas inflamatorias<sup>(25)</sup>, de igual forma lo hacen los osteoblastos en respuesta a estimulación con IL-6 e IL-1 $\beta$ <sup>(26)</sup>.

Respecto de TIMP-2, si bien observamos un nivel mayor al comparar su presencia en FGC proveniente de pacientes versus sujetos sanos, ese aumento no alcanza a compensar el aumento que se produce en el nivel de MMP-2, generándose un desbalance entre MMP-2 y TIMP-2, con un predominio de la presencia de la metaloproteinasas, lo que estaría relacionado con un patrón de destrucción.

En el presente estudio, los resultados de los ELISAs se consideraron para discusión expresados en cantidades absolutas de MMP-2 o TIMP-2 por sitio. Coincidimos con Golub y cols.<sup>(27)</sup> en que el método más sensible para calcular los niveles de moléculas presentes en FGC es la expresión de cantidades absolutas bajo un tiempo de colección de la muestra estandarizado (30 segundos), debido al pequeño volumen de muestra recolectada y a que el muestreo representa que el total o la mayor parte de FGC es removido del crístico del sitio en estudio<sup>(28)</sup>.

Dado lo anterior, nuestros resultados sugieren que uno de los roles que tendría la MMP-2 durante la periodontitis podría estar asociado a la hidrólisis de matriz extracelular. De hecho se ha descrito que existe una disminución de las fibras colágenas en tejido periodontal durante la periodontitis que correlaciona con un aumento significativo de la forma activa de la MMP-2<sup>(4)</sup>. Si bien el componente más afectado del periodonto es el colágeno tipo I, presente en el ligamento periodontal y en la matriz orgánica del hueso alveolar, MMP-2 puede participar en su hidrólisis en forma directa e indirecta, ya que participa de cascadas proteolíticas que llevan a la activación de otras enzimas que actúan con mayor eficiencia sobre colágeno I como son Pro-MMP-1 y Pro-MMP-13, ambas descritas en periodontitis, y en el caso de la MMP-13, asociada con la progresión de la enfermedad<sup>(7)</sup>. Al mismo tiempo, luego de la hidrólisis del colágeno I, MMP-2 podría participar hidrolizando colágeno desnaturalado, y otros elementos de la MEC como colágeno IV, componente fundamental de las membranas basales, fibronectina, y laminina<sup>(29)</sup>.

Se ha visto en modelos animales que la inducción de periodontitis a través de ligaduras estimula un aumento en la expresión de MMP-2, el que en principio estaría asociado a la ruptura de la membrana basal y luego podría estar asociado a la reabsorción de hueso alveolar<sup>(30)</sup>. De esta forma un aumento en los niveles de transcripción o actividad de MMP-2 en los tejidos periodontales podría potenciar la destrucción de colágeno durante la periodontitis, sugi-

riéndole un rol en la patogénesis de esta enfermedad<sup>(31)</sup>. Ahora bien, el hecho de que MMP-2 sea capaz de hidrolizar moléculas bioactivas y con ello modular su función, podría atribuirle también un rol regulador a este nivel.

## FINANCIAMIENTO

DI 06/05-2. FONDECYT 1090046.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Belibasakis y cols. Cytokine responses of human gingival fibroblasts to Actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin. *Cytokine*. 2005; 56-63.
2. Seymour G. y Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 167-173.
3. Page R. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol Res*. 1991; 26: 230-242.
4. Ejeil AL, Tchen SI, Ghomrasseni S et al. Expression of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingival. *J Periodontol*. 2003; 74: 188-195.
5. Tervahartiala T, Prilia E, Ceponis A y cols., The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13 and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res* 2000; 79: 1969 – 1977
6. Goncalves L, Oliveira G, Hurtado y cols. Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in inflamed gingival biopsies *J Periodont Res* 2008; 43: 570–577
7. Hernández M, Martínez B, Tejerina et al MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2007; 34: 729-35.
8. Danilewicz M, Sikorska B, Wagrowska-Danilewicz M (2003). Prognostic significance of the immunoeexpression of matrix metalloproteinase MMP2 and its inhibitor TIMP2 in laryngeal cancer. *Med Sci Monit* 9(3):MT42–MT47.
9. Kazes I, Elalamy I, Sraer JD et al (2000) Platelet release of trimolecular complex components MT1-MMP/TIMP2/MMP2: involvement in MMP2 activation and platelet aggregation. *Blood* 96(9):3064–3069
10. Tüter G, Kurtül B, Serdar M. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Periodontol* 2002; 73 (5): 487-93.
11. Tüter G, Kurtül B, Serdar M, Yücel A, Ayhan E, Karaduman B, Ozcan G.Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Clin Periodontol* 2005;32(9):1011-5.
12. Nagase H. 1997. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378:151– 160.
13. Leppä S, Saarto T, Vehmanen L et al (2004) High serum matrix metalloproteinase-2 level is associated with an adverse prognosis in node-positive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10(3):1057– 1063
14. Emingil y cols. Gingival crevicular fluid MMP-25 and -26 levels of patients with periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2006; 77: 664 – 671
15. Pozo P. y cols. Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontol Res*. 2005. 40:199-207.
16. Garlet GP, Martins JW, Fonseca BAI y cols. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclasts factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004; 31: 671-679.
17. Meikle MC, Hembry RM, Holley J et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinases and TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases) in human gingival tissues from periodontitis patients. *J Periodontol Res*. 1994; 29: 118-26
18. Bordineau A, Godeau G, Brousse N et al. Langerhans cells express matrix metalloproteinases 9 and 2 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in healthy human gingival tissue and in periodontitis. *Oral Microbiology Immunology* 2006; 21: 197-200.
19. Lin S, Chiang C, Hong C y cols. Immunolocalization of interstitial collagenase (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in radicular cysts. *J Oral Pathol Med*. 1997; 26: 458-63.
20. Zhou J, Windsor LJ. Porphyromonas gingivalis affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. *J Periodontol Res*. 2006 Feb;41(1):47-54.
21. Qin H, Sun Y & Benveniste EN (1999) The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J Biol Chem* 274: 29130–7.
22. Katono T, Kawato T, Tanabe N. Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen activators, and their inhibitors in human osteoblasts. *Arch Oral Biol*. 2009; 54: 146-55
23. Kang BS, Park YG, Cho JY et al. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha induce collagenolysis and bone resorption by regulation of matrix metalloproteinase-2 in mouse calvarial bone cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2003; 25: 347-64.
24. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003; 74: 391-401
25. Rutherford R. *Cirugía vascular*. 6a Edición. Elsevier España. 2006; Cap 29: 479.
26. Damiens C, Fortun Y, Charrier C y cols. Modulation by soluble factors of gelatinase activities released by osteoblastic cells. *Cytokine*. 2000; 12(11):1727-31.
27. Golub L, Lee H, Greenwald R y cols. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in GCF during periodontitis. *Inflamm Res* 1997; 46: 310-319
28. Adonogianaki E, Mooney J, Kinane DF. Detection of stable and active periodontitis sites by clinical assessment and gingival crevicular acute-phase protein levels *J Periodontol Res*. 1996;31: 135-43
29. Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmor BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA & Goldberg GI (1988) H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 263: 6579–87.
30. Achong R, Nishimura I, Ramachandran H Membrane type (MT) 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 expression in ligature-induced periodontitis in the rat. *J Periodontol*. 2003; 74: 494-500
31. Korostoff JM, Wang JF, Sarment DP y cols. Analysis of in situ Proteinase activity in chronic adult periodontitis patients: Expression of activated MMP-2 and 40-kDa serin protease. *J Periodontol* 2000; 71: 353-360.

## CORRESPONDENCIA AUTOR

Nicolás Dutzan Muñoz.

Laboratorio de Biología Periodontal, Departamento de Odontología Conservadora, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Sergio Livingstone 943, Comuna de Independencia, Santiago, Chile.

Fono: 56 2 978 18 33.

Fax: 56 2 978 1839.

ndutzan@gmail.com

Trabajo recibido el 25/07/2009.

Aprobado para su publicación el 18/08/2009.