

Caracterización de Perfiles Proteicos y Peptídicos en Periodontitis Crónica

Characterization of Protein and Peptide Profiles in Chronic Periodontitis

Hernández M^{1,3}, Obregón F¹, Pozo P¹, Barriga A², Valenzuela MA².

RESUMEN

La destrucción de los tejidos de soporte durante la periodontitis crónica está mediada por proteasas específicas. Producto de la actividad proteolítica se generarán cambios en la composición peptídica y proteica globales del fluido crevicular gingival (FCG). El objetivo de este estudio es evaluar la existencia de patrones de proteicos y peptídicos característicos en el FCG de pacientes con periodontitis crónica y sanos.

Materiales y métodos: Se seleccionaron 8 pacientes con periodontitis crónica moderada a severa y 5 sujetos controles y se obtuvieron muestras de FCG. Las muestras se eluyeron en 2 tampones, y se prepararon en 3 matrices distintas, y se obtuvieron los espectros peptídicos y proteicos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Se procesaron 3 espectros de cada grupo para la obtención final de espectros diferenciales en enfermos.

Resultados: Se obtuvieron patrones proteicos y peptídicos reproducibles en el FCG. En pacientes con periodontitis crónica encontramos perfiles característicos representados por más de 100 proteínas que no fueron detectables en sujetos sanos.

Conclusiones: Demostramos la utilidad de la aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF en el análisis de cambios cualitativos en la composición global del FCG y presentamos los perfiles proteicos y peptídicos característicos del FCG en periodontitis crónica y sujetos sanos.

Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral Vol 1(2); 53-56, 2008.

Palabras claves: Periodontitis crónica, FCG, MALDI-TOF, perfiles proteicos.

ABSTRACT

Inflammatory response mediates periodontal tissue destruction occurring in chronic periodontitis. As result, qualitative changes in global peptide and protein GCF composition will generate.

Aim: To evaluate existence of characteristic peptide and protein profiles in gingival crevicular fluid (GCF) from patients with chronic periodontitis and controls.

Methods: Patients with moderate to severe chronic periodontitis (n=8) and healthy controls (n=5) were selected and samples of GCF were obtained. Samples were eluted in 2 different buffers and prepared with 3 matrices to obtain peptide and protein spectra by MALDI-TOF mass spectrometry analysis. Subsequently, 3 spectra from each group were processed to obtain final differential spectra.

Results: Reproducible peptide and protein profiles were obtained from both stages in GCF. In disease samples we found characteristic patterns represented by more than 100 proteins which were undetectable in controls.

Conclusions: We demonstrate for the first time the usefulness of MALDI-TOF mass spectrometry in the analysis of qualitative global changes in GCF composition and we present protein and peptide characteristic GCF profiles associated with chronic periodontitis and healthy periodontium.

Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral Vol 1(2); 53-56, 2008.

Key words: Chronic periodontitis, GCF, MALDI-TOF, protein profiles.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis crónica es una enfermedad infecciosa caracterizada por la destrucción de los tejidos de inserción dentarios, es decir, el ligamento periodontal, el hueso alveolar y cemento radicular⁽¹⁾. La inflamación gingival conlleva la formación de un exudado, el fluido crevicular gingival (GCF), cuya composición es similar a la del suero, aunque varía en función del proceso inflamatorio⁽²⁾.

El FCG presenta componentes derivados del plasma (albúmina, cadenas pesadas de IgG, transferrina), tejido conectivo, células hospederas del periodonto y placa subgingival. La formación del FCG en sitios libres de inflamación y de placa subgingival está mediada por la difusión pasiva del líquido extracelular de los tejidos periodontales, a través de la lámina basal y las células de los epitelios sulcular y de unión. En condiciones inflamatorias en cambio, aumenta la permeabilidad vascular y epitelial, de modo que la concentración de proteínas

del fluido queda modulada por la extensión del exudado plasmático, fundamentalmente albúmina y otras proteínas de mayor peso molecular. Durante la periodontitis, también aparecerán componentes no derivados del plasma, como mediadores y productos de la destrucción de matriz extracelular periodontal, principalmente colágenos I y III⁽³⁾.

Entre los mediadores de destrucción periodontal se encuentran proteasas específicas, que inducen la degradación de la matriz extracelular y la activación de otras enzimas en el tejido periodontal. Entre las principales enzimas involucradas, figuran las serina proteasas y las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs)^(4,5,6). Su actividad proteolítica no se limita simplemente al catabolismo de proteínas: regulan el destino y actividad de muchas otras proteínas mediante el control de su localización intra o extracelular, liberándolas de la superficie celular, activando o inactivando proteasas u otras enzimas, citoquinas, hormonas y factores de crecimiento, mediante la conversión de receptores agonistas en antagonistas y la exposición de

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

2. Depto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Chile.

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

proteínas crípticas^(5,7,8,10).

En síntesis, los cambios en la composición del FCG están mediados por la extravasación de proteínas desde el plasma, la síntesis y procesamiento de mediadores inflamatorios y productos de degradación del tejido⁽¹¹⁾. En estudios previos en geles SDS-PAGE se han determinado patrones regulares de composición del FCG entre los pacientes sanos y diferencias marcadas en la composición proteica del FCG de éstos, en relación con enfermos, observándose variaciones en la proporción de proteínas séricas como albúmina y transferrina.

La identificación de predictores de progresión representa una meta fundamental en periodoncia, debido a que resulta difícil predecir la evolución de las lesiones periodontales sobre los parámetros clínicos. Se han propuesto numerosos mediadores bioquímicos como indicadores de progresión de la enfermedad periodontal en el fluido crevicular gingival (FCG)⁽²⁾, como fosfatasa alcalina, MMP-8, Dipeptidil peptidasas II y IV, elastasa, calprotectina⁽¹²⁾ y MMP-13^(13,14); sin embargo, ninguno de ellos constituye en sí un indicador confiable que permita predecir nuevos episodios de pérdida de inserción⁽¹²⁾.

El análisis global de la composición del FCG permitirá caracterizar las alteraciones del sistema en la enfermedad. De este modo, el examen de la composición global del FCG y sus variaciones durante los estados de salud y enfermedad periodontal permitirán identificar perfiles proteicos y peptídicos característicos, reflejo de los procesos metabólicos asociados con la destrucción del tejido óseo y ligamento periodontal y a través del análisis de éstos, la identificación de marcadores y/o predictores de progresión en sitios específicos^(3,15).

El objetivo de este estudio es evaluar la existencia de patrones de proteicos y peptídicos característicos en el FCG de pacientes con periodontitis crónica y sanos.

METODOLOGÍA

Selección de pacientes

Los pacientes se seleccionaron en el Servicio de Recepción de Pacientes de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile y del SSMN, CDT Eloísa Díaz. Se incluyeron sujetos con periodontitis crónica moderada a severa según los siguientes criterios: presencia de un mínimo de 14 dientes, excluyendo los terceros molares, de los cuales al menos 6 eran dientes posteriores; de severidad moderada a avanzada: al menos 5-6 dientes con bolsas periodontales ≥ 5 mm, pérdida de inserción ≥ 3 mm y pérdida de hueso determinada en una radiografía; no haber recibido nunca tratamiento periodontal; sin enfermedad sistémica que pueda afectar la patología de la periodontitis y/o que requiera premedicación médica; sin medicación de antibióticos o de antiinflamatorios en los últimos 3 meses. Los sujetos del grupo control corresponden a voluntarios sin enfermedad periodontal. El protocolo del estudio previamente evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología, se explicó a todos los pacientes, quienes firmaron el consentimiento informado.

Recolección de Fluido Crevicular Gingival (FCG)

Las muestras de FCG se obtuvieron a partir de sacos periodontales de 8 pacientes con periodontitis crónica y 5 controles. Las piezas seleccionadas se aislaron con rollos de algodón, previa remoción de la placa bacteriana supragingival. El sitio fue secado cuidadosamente con una jeringa de aire y el fluido se recolectó con tiras de papel Periopaper® (ProFlow, Amityville, New York) introducidas dentro de un tubo eppendorf estéril y se almacenaron a -80°C hasta su elución.

Análisis del fluido gingival crevicular

Después de recolectado el fluido, 3 muestras correspondientes a enfermos y 3 a sanos se extrajeron desde las tiras de papel en un tubo eppendorf con 100 μL de amortiguador de elución Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 0,2 M, CaCl₂ 5 mM, Tritón X-100 al 0,01%, mientras que otras 7 muestras (5 enfermos y 2 controles) se extrajeron en ácido fórmico al 0,02% y centrifugación a 10.000 g por 5 min a 4°C . Las muestras se mantuvieron a -80° hasta su posterior utilización.

Espectrometría de masas

Las muestras se prepararon en tres matrices: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) a una concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo/ácido fórmico 0,1% v/v 1:1 para el análisis de péptidos de masa molecular menor a 10 kDa; ácido sinapínico (SA) para péptidos y proteínas de masa molecular mayor a 10 kDa y una tercera matriz, ácido 2,5-dihidroxi benzoico (DHB) para análisis de péptidos y/o glicopéptidos, proteínas y/o glicoproteínas, polímeros y carbohidratos. Las matrices SA y DHB se prepararon a una concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo/ácido fórmico 0,1% v/v 1:2.

Para la obtención de los espectros, se mezcló 1 μL de cada muestra con 9 μL de cada matriz (dilución 1:10) y se depositó 1 μL en una placa porta muestra micro scout. Los espectros se obtuvieron en un equipo Microflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Inc. MA-USA). Previo a la obtención de espectros se realizó una calibración del equipo con un estándar externo para cada intervalo de m/z examinado. Para la obtención de los espectros se trabajó en modo ion positivo y detección en reflexión para el intervalo de m/z 0-4000 y en modo ion positivo y detección lineal para los intervalos de m/z de 5000-20000 y 10000-25000 (se usaron los parámetros por defecto). Los espectros finales corresponden a espectros sumados correspondientes a 10 barridos de láser aplicados en diferentes puntos tomados al azar.

Los espectros obtenidos fueron procesados (eliminación de línea base) y exportados utilizando el programa flexAnalysis v2.2 (Bruker Daltonik GmbH, Germany). Se generaron espectros promedio para las muestras y controles utilizando el programa SpecAlign v2.2.1 (University of Oxford, England). A partir de éstos, mediante el mismo programa se generaron los espectros diferenciales y los listados m/z. Finalmente, la visualización de los espectros diferenciales y sus respectivas señales m/z se realizó mediante el programa mMass v2.4 (Institute of Chemical Technology, Rep Checa).

El análisis estadístico de las características clínicas de los sujetos y controles se realizó empleando el programa Intercooled Stata V8.1 (Stata Corp. Texas, USA), y se aplicó el test de Mann Whitney. Se consideró significancia estadística cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se analizaron los espectros peptídicos y proteicos de FCG provenientes de 13 sujetos, de los cuales 8 presentaban periodontitis crónica severa a moderada y 5 correspondientes a controles. Las características clínicas de los sujetos se presentan en la tabla 1; no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos con respecto a edad y género, mientras que todos los parámetros clínicos variaron significativamente entre ambos grupos.

Las muestras de FCG se eluyeron en dos tampones, correspondientes a Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 0,2 M, CaCl₂ 5 mM y Tritón X-100 al 0,01% y en ácido fórmico 0,02%, para establecer cuál de ellos era más apropiado para realizar el análisis por MALDI-TOF. Los espectros obtenidos a partir de muestras eluidas en tampón Tris demostraron una mayor sensibilidad y menor ruido que aquellas eluidas en ácido fórmico (datos no mostrados).

Para evaluar qué tipo de matriz es era más apropiada para la obtención de espectros correspondientes a los distintos rangos de masas de péptidos y proteínas detectables en el FCG, según sensibilidad y resolución de éstos, las muestras se prepararon con tres matrices distintas. La matriz CHCA demostró mayor sensibilidad para péptidos entre 2-4 kDa (Figura 1), mientras que para los péptidos de masa mayor, el ácido sinapínico (Figuras 2 y 3).

El espectro correspondiente al intervalo de péptidos menores a 2000 Da no se pudo analizar debido a la presencia de un polímero no identificado (resultados no mostrados).

Al analizar los espectros obtenidos entre sujetos con periodontitis y entre sujetos sanos, observamos patrones proteicos y peptídicos repetidos y por tanto reproducibles, para todos los rangos de peso molecular analizados (4-250 kDa). Al comparar los espectros entre sujetos enfermos y sanos se observaron notables variaciones en los perfiles peptídicos y proteicos y por tanto, cambios en la composición del FCG correspondiente a cada grupo. El grupo con periodontitis, muestra un aumento de las proteínas y péptidos que componen el FCG en relación con los controles, fundamentalmente entre 2500 y 75000 Da (Figuras 1, 2 y 3).

Mediante la obtención de los espectros promedio correspon-

dientes a cada grupo, se obtuvieron espectros diferenciales y a partir de éstos, los listados m/z, que representan el conjunto de proteínas y péptidos detectables en todas las muestras enfermas y a la vez, ausentes en todos los controles estudiados (Tabla 2).

Tabla 1. Parámetros clínicos de los sitios estudiados de pacientes con periodontitis crónica y controles.

	Controles (n = 5)	Periodontitis (n = 8)
Edad (años)	37,2±5,16	45,6±10,92
Mujeres	3	5
Profundidad de saco (mm)	1,72±0,51*	6,33±0,57*
Nivel de inserción (mm)	0,52±0,21*	6,28±1,88*
% sitios con placa	0	100%
% sitios con sangramiento al sondaje	0	100%

*Valores expresados como promedios±DS. *p<0.05

Tabla 2. Espectro diferencial Intervalo de masas 5-20 kDa y 10-250 kDa (Matriz SA).

5 - 20 kDa			10 - 250 kDa		
#	m/z	intensity	#	m/z	intensity
1	10636.50	0.67	1	5006.39	153.56
2	10875.20	40.33	2	5049.68	132.07
3	11085.90	33.33	3	5113.92	147.38
4	11824.90	232.33	4	5140.46	72.67
5	12704.80	1226.00	5	5160.80	75.41
6	13279.40	1483.67	6	5225.22	66.16
7	13300.40	1486.66	7	5315.96	106.28
8	13441.90	1311.66	8	5420.86	355.67
9	15141.80	17296.70	9	5630.46	141.05
10	15341.40	5911.34	10	5725.75	108.67
11	15895.80	7159.33	11	5773.69	140.09
12	16051.40	4183.00	12	5864.61	95.17
13	30276.20	518.00	13	5941.67	191.57
14	31044.00	650.33	14	6074.04	54.66
15	31204.70	588.00	15	6105.80	51.56
16	32062.30	329.67	16	6131.95	95.44
17	66429.30	304.00	17	6350.11	134.18
18	66433.10	327.00	18	8397.23	95.09
19	81532.40	54.00	19	6450.70	79.62
20	92157.30	21.67	20	6469.98	66.79
			21	6493.96	82.61
			22	6650.68	1776.99
			23	6730.34	100.68
			24	6767.95	209.26
			25	6856.13	203.80
			26	6969.12	197.28
			27	7061.64	59.92
			28	7272.67	87.01
			29	7438.46	109.78
			30	7493.72	58.66
			31	7572.57	1916.87
			32	7678.64	408.95
			33	7717.45	669.87
			34	7782.07	68.44
			35	7838.59	53.25
			36	7880.47	69.25
			37	7943.17	966.33
			38	7997.02	81.27
			39	8047.14	202.48
			40	8100.69	121.34
			41	8317.98	60.42
			42	8875.16	55.27
			43	9067.21	93.90
			44	9178.97	95.85
			45	9207.54	83.45

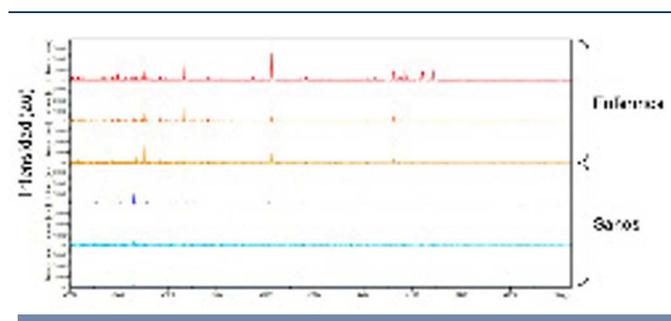


Figura 1. Espectro de péptidos del FCG entre 2-4 kDa (matriz CHCA).

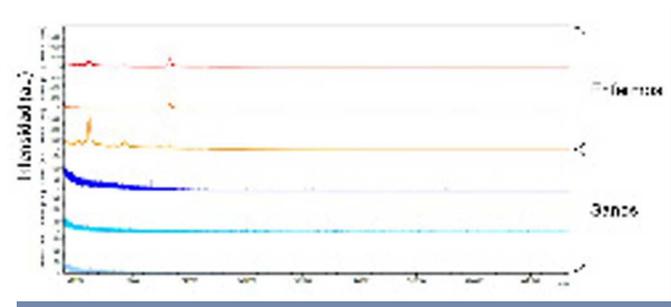


Figura 2. Espectro de péptidos y proteínas del FCG entre 2-20 kDa (matriz SA).

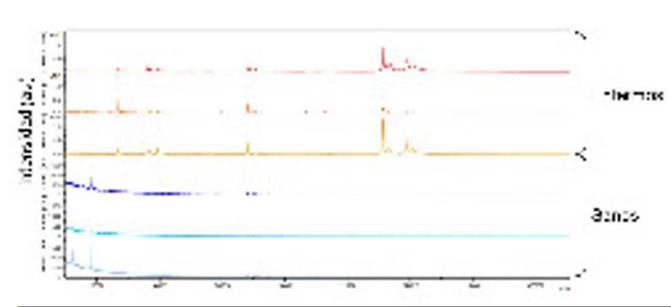


Figura 3. Espectro de proteínas del FCG entre 20-250 kDa (matriz SA).

DISCUSIÓN

Las enfermedades periodontales son un grupo de patologías multifactoriales que involucran destrucción de los tejidos duros y blandos periodontales, como resultado principalmente de la activación de la respuesta inmunoinflamatoria del hospedero frente a la infección bacteriana, que incluye la producción de citoquinas, eicosanoides y MMPs⁽¹⁶⁾. La destrucción de los tejidos de soporte es el hecho característico de la periodontitis crónica y ocurre durante la progresión de la enfermedad⁽¹⁷⁾.

Hasta la fecha se han analizado más de 100 componentes del FCG y su potencial utilidad en la detección de la periodontitis⁽¹²⁾; sin embargo, considerando que los sistemas de proteasas trabajan en forma sinérgica y son altamente redundantes⁽⁵⁾, el análisis de los cambios globales en la composición del FCG podría ser de mayor utilidad en la caracterización de los distintos estados de salud-enfermedad del periodonto.

Nuestros resultados demuestran la existencia de patrones proteicos y peptídicos característicos en el FCG de pacientes con periodontitis crónica que difieren sustancialmente de los patrones obtenidos en sujetos sanos.

Estudios previos han descrito cambios en la composición del FCG entre individuos sanos y con periodontitis crónica. Mediante electroforesis en geles SDS-PAGE se ha determinado la existencia de patrones regulares en la composición del FCG en sujetos sanos y enfermos, demostrando diferencias marcadas entre ambos; principalmente con respecto a la proporción de proteínas séricas como albúmina y

transferrina, que aumentan considerablemente en enfermos. En modelos de periodontitis inducida por ligaduras en perros, el análisis del FCG mediante electroforesis bidimensional ha demostrado aumentos de proteínas con masas inferiores a 64 kDa en comparación con gingivitis, fenómeno que podría atribuirse al aumento de la actividad proteolítica en el crévice gingival⁽³⁾.

Además de los cambios cualitativos, en estudios recientes hemos observado aumentos considerables en la concentración de proteínas totales de pacientes con periodontitis v/s sanos y en sitios activos v/s inactivos de pacientes con periodontitis progresiva⁽¹⁴⁾.

En conformidad con estos antecedentes, mediante análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF, en el presente estudio hemos detectado patrones reproducibles en la composición del FCG de sujetos enfermos y controles. Adicionalmente, observamos cambios característicos en la composición del FCG de los sujetos con periodontitis crónica en comparación con los sanos, representados por la detección de más de 100 proteínas que no se encuentran en los controles. De este modo, la identificación de estas variaciones en el FCG podría representar una herramienta de utilidad en el diagnóstico de los estados de salud y enfermedad periodontal producto de la periodontitis crónica.

El rango donde se observó la mayor variabilidad entre ambos grupos, se encontró entre los 2500 y 75000 Da, lo que concuerda con estudios previos, donde el área de mayor PM correspondería fundamentalmente a proteínas extravasadas desde el suero, como albúmina, transferrina y α -1 antitripsina⁽²⁾.

Por otro lado, las proteínas de menor peso molecular y péptidos, podrían reflejar en parte la actividad proteolítica de los tejidos periodontales, caracterizada por la degradación de matriz extracelular y la activación de otras enzimas⁽⁵⁾.

Consecuentemente, se ha propuesto que estas proteínas y péptidos podrían corresponder fundamentalmente a productos y media-

dores de destrucción tisular local o de origen bacteriano^(10,18), entre los cuales se han identificado defensinas HNP-1, -2 y -3^(19,20) y calprotectinas-A y -B⁽²⁾.

El estudio de la periodontitis crónica a través del análisis del FCG representa un método no invasivo⁽¹⁹⁾; sin embargo, un inconveniente en la caracterización de este fluido está representada por los escasos volúmenes posibles de obtener a partir del surco gingival o saco periodontal, limitando el análisis a la detección de un sólo analito⁽²⁰⁾. Por esta razón, la utilización de la espectrometría de masas MALDI-TOF en este estudio, ha demostrado ser un método útil y relativamente sensible para el análisis de los cambios en la composición global del FCG. Sin embargo, se requieren estudios posteriores que conduzcan a la identificación de las proteínas de interés, mediante análisis de electroforesis bidimensional, determinación de masas por huellas peptídicas y secuenciación MS/MS, para comprender en mayor profundidad la patogenia de la enfermedad y proponer nuevos marcadores de destrucción periodontal.

Como conclusión, en este trabajo se demuestra por primera vez la utilidad de la aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF en el análisis de cambios cualitativos en la composición global del FCG y presentamos los perfiles proteicos y peptídicos característicos del FCG en periodontitis crónica y sujetos sanos.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Proyecto DI MULT 06/05-2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borrell LN, Papapanou PN. Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32(Suppl. 6):132-158.
- Kojima T, Andersen E, Sanchez JC, Wilkins MR, Hochstrasser DF, Pralong WF, Cimasoni G. Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S100A8) and MRP14 (A100A9), two calcium binding proteins of the S100 family. *J Dent Res* 2000;79(4):740-747.
- Curtis MA, Sterne J, Price SJ, Griffiths GS, Coulthurst SK, Wilton JM, Johnson NW. The protein composition of gingival crevicular fluid sampled from male adolescents with no destructive periodontitis: Baseline data of a longitudinal study. *J Periodont Res* 1990;25:6-16.
- Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tsesche H, Haerian A, Kinane DF, Kontinen YT, Sorsa T. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23:1127-1132.
- López-Otín C, Overall C. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 509-519.
- Puente X, Sánchez L, Overall C, López-Otín C. Human and Mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 2003;4:544-556.
- Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteinases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:383-388.
- VanSaun MN, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases and cellular motility in development and disease. *Birth Defects Res (part C)* 2006;78:69-79.
- Overall CM, Dean RA. Degradomics: Systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:69-75.
- Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovascular Res* 2006;69:614-624.
- Overall C, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontology* 2000,2003;31:77-104.
- Loos BG, Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontol* 2000. 2005;39:53-72.
- Hernández M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, Alvarez J, Lopez JM, Vernal R, Gamonal J. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol*. 2006 Nov;77(2):1863-70.
- Hernández M, Martínez B, Tejerina JM, Valenzuela MA, Gamonal J. MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2007 Sep;34(11):729-35.
- Adonogianaki E, Mooney J, Kinane DF. Detection of stable and active periodontitis sites by clinical assesment and gingival acute phase protein levels. *J Periodont Res* 1996;31(4):135-143.
- Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 108-129.
- Vernal R, Chaparro A, Graumann R, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor κ B ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2004, 75:1586-1591.
- Mäkelä M, Söderling E, Paunio K, Talonpoika J, Hyypä T. Protein composition of crevicular fluid before and after treatment. *Scand J Dent Res*. 1991 Oct;99(7):413-23.
- Lundy FT, Orr DF, Shaw C, Lamey PJ, Linden GJ. Detection of individual human neutrophil alpha-defensins (human neutrophil peptides 1, 2 and 3) in unfractionated gingival crevicular fluid - a MALDI-MS approach. *Mol Immunol*. 2005 Mar;42(7):575-9.
- Pisano E, Cabras T, Montaldo C, Piras V, Inzitari R, Olmi C, Castagnola M, Messana I. Peptides of human gingival crevicular fluid determined by HPLC-ESI-MS. *Eur J Oral Sci*. 2005 Dec;113(8):462-8.

CORRESPONDENCIA AUTOR

Marcela Hernández Ríos

mhernandezrios@gmail.com

Trabajo recibido el 31/03/2008.

Aprobado para su publicación el 13/05/2008.