

NIVELES EXTRACELULARES DE GLUTAMATO Y ASPARTATO EN EL FLUIDO GINGIVAL EN LA PERIODONTITIS

Recibido para arbitraje: 15/12/2005

Aprobado para publicación: 26/01/2005

- **Natalia Aguilera:** Profesora Agregado del Departamento de Odontología Restauradora, Cátedra de Clínica Integral, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela
- **Elizabeth Silva,** Profesora Titular del Departamento de Fisiología y Laboratorio de Fisiología de la Conducta, Escuela de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Miembro de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia (AsoVAC), Asociación Venezolana para el Estudio del Dolor (AVED) y la Internacional Association for the Study of Pain (IASP).
- **Belkis Quiñónez,** Profesora Asociado del Departamento de Biopatología, Cátedra de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Correspondencia dirigida a: Elizabeth Silva, Apartado postal 109. Mérida 5101, Venezuela
Correo electrónico: rosas@ula.ve

Reconocimientos: Agradecemos al Dr. Luis Hernández por su colaboración y al Proyecto # 0-077-00-07-C y M-823-05-03-B del Consejo del Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico de la Universidad de los Andes (CDCHT-ULA).

Resumen

El objetivo de este trabajo fue comparar los niveles extracelulares de glutamato y aspartato en el fluido del surco gingival (GCF) de personas adultas, en la periodontitis crónica localizada inducida por placa (PCIP) y la gingivitis inducida por placa (GIP)

La enfermedad periodontal produce cambios inflamatorios en los tejidos de sostén de las piezas dentales afectadas. El análisis químico del GCF, con diferentes métodos de colección y análisis, ha sido usado para determinar la presencia de algunos elementos inflamatorios que aparecen en la enfermedad periodontal, tales como diversas enzimas, aminoácidos, etc.

Las muestras del GCF se tomaron con la técnica de microdiálisis en las zonas dentales con PCIP con una profundidad del surco ≥ 3 mm; pérdida de soporte ≥ 2 mm y en las zonas dentales con GIP en el mismo paciente (n=10) Total de muestras: 100. Para medir el glutamato y aspartato en el GCF se usó la técnica de electroforesis capilar acoplada a laser con detección inducida por fluorescencia (CZE-LIFD).

Los resultados mostraron que en los dientes con PCIP el glutamato disminuyó ($p < 0.05$) y el aspartato aumentó ($p < 0.02$) en comparación con los dientes con GIP.

Palabras clave: periodontitis, glutamato, aspartato, electroforesis capilar, fluido gingival.

Abstract

The objective of this work was to compare glutamate and aspartate levels in periodontal chronic localized disease (PCIP) and dental zones with gingivitis (GIP) in the gingival crevicular fluid (GCF).

Periodontal inflammation produces histological changes, increase of blood irrigation and also increase of subgingival fluid. GCF was recognized as an inflammatory exudes derived from the periodontal tissue. Different methods to collect and analyze GCF samples had been used to identify some substances in the GCF, such as the proteinglycans metabolite, to be a possible marker of active periodontal disease.

A combination of microdialysis in situ in dental zones with PCIP (probing depth ≥ 3 mm; attachment level ≥ 2 mm) and dental zones with GIP (n=10), total samples: 100, and capillary zone electrophoresis coupled to a laser induced fluorescence detection (CZE-LIFD) was used to measure extracellular concentrations of amino acids: glutamate and aspartate in the GCF in adult patients

The results showed that glutamate decrease ($p < 0.05$) and aspartate increase ($p < 0.02$) in PCIP disease zones compared with dental zones with GIP. We observed chemical in vivo evidence that differentiate the

GIP zones and PCIP zones.

INTRODUCCION

La enfermedad periodontal se caracteriza por ser episódica, progresa de manera alterna con etapas activas e inactivas. El fluido gingival normal es el transudado de fluido intersticial del tejido gingival, pero en la periodontitis se transforma en un exudado inflamatorio verdadero y aumenta su tasa de flujo (1). El fluido gingival es una mezcla compleja de sustancias derivadas del plasma, leucocitos, células estructurales del periodonto y bacterias orales. La destrucción de los tejidos en la periodontitis da como resultado la aparición de fragmentos de tejidos, factores de crecimiento liberados y otras sustancias (2). Entre los materiales utilizados para la recolección de las muestras de fluido gingival, encontramos las tiras de papel absorbente, de las cuales se han evaluado diferentes materiales (3), cabos entrelazados de hilo colocados alrededor y dentro del surco, micropipetas y lavados en el interior del surco (2).

En cuanto al análisis de las muestras del fluido gingival se han empleado pruebas colorimétricas mediante el uso de tests químicos que ponen de manifiesto la presencia de algunas sustancias contenidas en el fluido gingival. Ejemplos de estos son el PerioGard (4,5), y el PocketWatch, (6). La técnica de microdiálisis para tomar muestras de fluido extracelular ha sido reportada por O'Brien (7). Sin embargo, la técnica de microdiálisis para la recolección de la muestra de fluido gingival crevicular no ha sido reportada en la literatura. La técnica consiste en colocar una microcánula para diálisis en el surco gingival de la pieza dentaria con el fin de permitir la libre difusión del fluido con sus solutos, entre ellos el aspartato y el glutamato.

En el análisis del fluido gingival se han encontrado más de cuarenta compuestos, entre ellos, proteínas, anticuerpos y antígenos específicos, enzimas y componentes celulares. Estos últimos incluyen bacterias, células epiteliales descamadas y leucocitos: polimorfonucleares, linfocitos, monocitos y neutrófilos, hidroxiprolina (8), IL1 β , TNF α , elastasa, osteocalcina, proteoglicanos, fragmentos de fibronectina, etc (9). Las enzimas contenidas en el fluido gingival tienen dos fuentes de origen: a) la lesión tisular y b) las bacterias. Las enzimas son liberadas de las células del huésped durante el desarrollo y progresión de la enfermedad periodontal, y de las bacterias contenidas en la placa bacteriana, por ejemplo la colagenasa y elastasa. Estas enzimas pueden degradar los tejidos del huésped y por lo tanto contribuir al proceso destructivo de la enfermedad periodontal. Algunas de estas enzimas son utilizadas como marcadores potenciales de las lesiones periodontales. Entre las enzimas que mayormente se han investigado a través de estudios experimentales encontramos: aspartato aminotransferasa, β -glucuronidasa, lactato deshidrogenasa, aril sulfatasa, colagenasa, y elastasa, (2,10). Sin embargo, para otros investigadores existen algunos componentes del fluido gingival que están altamente relacionados con los niveles de actividad de la enfermedad periodontal, específicamente en la bolsa periodontal, como son: prostaglandinas E, hidroxiprolina, productos de la lesión de la matriz extracelular, además de enzimas hidrolíticas, enzimas derivadas de los neutrófilos, colagenasa, lactato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa (11).

La enzima, aspartato aminotransferasa (AST), es una enzima intracelular, se encuentra a nivel del citoplasma y de las mitocondrias de todas las células. A nivel mitocondrial la enzima sintetiza aspartato a partir de oxalacetato y -cetoglutarato a partir del glutamato y en el citoplasma la AST sintetiza glutamato a partir del -cetoglutarato y oxalacetato a partir del aspartato (12). El glutamato y aspartato son aminoácidos estructurales de los glucosaminglucanos sulfatados los cuales a su vez forman parte de algunos metabolitos de los proteoglicanos como lo son el decorin y biglican. El glucosaminglucano sulfatado ha sido detectado en el fluido gingival de pacientes con periodontitis avanzada, en los cuales hay destrucción de tejido óseo, por lo tanto el puede ser usado como un biomarcador de la destrucción activa del hueso alveolar (13).

La presencia del aspartato y glutamato, como aminoácidos libres, en el fluido gingival ha sido reportada por Syrjänen (14). La enzima AST es liberada al torrente sanguíneo por la muerte celular y también por los cambios en la permeabilidad de la membrana celular (11). Los cambios en la permeabilidad celular -a nivel del tejido periodontal- están relacionados con el aumento en la permeabilidad vascular del tejido periodontal. Esta alteración tisular es una característica de la respuesta inflamatoria de la enfermedad periodontal (10). Una vez que la enzima es liberada por la célula huésped, llega al surco gingival por un mecanismo de microfiltración del epitelio del surco. Se ha encontrado que las células derivadas del periodonto sano - fibroblastos gingivales, fibroblastos del ligamento periodontal, células epiteliales gingivales- son las principales fuentes de origen de la AST (11). Los niveles de AST se deben, principalmente, a la destrucción de las células provenientes del periodonto y su aumento parece estar asociado con una enfermedad periodontal activa (15). El aumento de los niveles de AST, en el fluido gingival, está relacionado con la destrucción periodontal, y con la inflamación del tejido gingival (16). En un estudio longitudinal, se monitorearon los niveles de la enzima AST en el fluido gingival de 31 pacientes con periodontitis de leve a moderada, y se concluyó que los aumentos en los niveles de la AST son mayores cuando se detectan sitios activos de enfermedad periodontal, ya que en aquellos sitios que presentaron gingivitis en ausencia de periodontitis o en aquellas zonas que tenían una pérdida de inserción previa al estudio, los niveles de la AST no fueron significativamente altos (17). La enzima AST además de estar relacionada con la destrucción o lesión local del periodonto y con microorganismos presentes en la enfermedad periodontal (18). Además determinó el aumento de la AST, en pacientes con enfermedad periodontal crónica, y una alta prevalencia de presencia del *Porphyromonas gingivalis* (19). Este microorganismo junto con el *Fusobacterium nucleatum* están asociados con la periodontitis del adulto (20). La destrucción del tejido periodontal se caracteriza por presentar dos fases: una activa - destrucción del tejido periodontal- en la cual ocurre destrucción de tejido conectivo y soporte óseo, representados por pérdida de inserción clínica, y una fase inactiva, en donde el tejido inflamado mantiene un estado de equilibrio (21,10,11,19). Por lo tanto, los índices variados de progreso de la enfermedad periodontal, permite utilizar los

marcadores de diagnóstico del GCFI (22).

En esta investigación se determinaron y compararon los niveles del glutamato y aspartato y en el GCF de personas adultas con piezas dentarias con GIP y otras piezas con PCIP.

MATERIALES Y METODOS

Selección de los pacientes.

Se seleccionaron diez (10) pacientes de ambos sexos, en edades comprendidas entre 30 y 45 años, siete (7) fueron del sexo femenino y tres (3) del sexo masculino con un promedio de edad de 40 años. Los pacientes se seleccionaron en la cátedra de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de los Andes. Se escogieron piezas dentarias con GIP del mismo paciente, sin evidencia de enfermedad periodontal esto es sin pérdida de sostén del diente, radiográficamente sano y sin sacos periodontales y dientes con PCIP.

La PCIP es localizada porque los dientes involucrados eran < de 30%, con una pérdida de inserción clínica de 3,8 mm. La placa supra gingival se determinó con el índice de O`Leary que señala la presencia o ausencia de placa utilizando un revelador para ella. En la PCIP hubo una pérdida ósea vertical u horizontal de 2 a 3 mm y en las piezas sanas no hubo pérdida ósea.

En la primera sesión, se realizó una profilaxis superficial de las piezas dentarias, para eliminar los cálculos más grandes, a todos los pacientes. Se eligieron las piezas dentarias: 2 dientes de cada paciente uno con GIP y uno con PIPC. Los dientes seleccionados fueron del sector antero superior, es decir de central, lateral o canino, por cara vestibular a nivel de su tercio mesial o distal. De cada diente se tomaron 5 muestras, total de muestras para análisis: 100. En una segunda sesión, 7 días después, se procedió a de la toma de muestra. En sesiones posteriores se continuó con los raspados y alisados radiculares. Al cabo de cuatro meses se evaluó esta fase de tratamiento, determinando la detención de la enfermedad periodontal. Ninguno de los pacientes tenían enfermedades sistémicas y no recibieron ningún tipo de tratamiento con antibióticos o terapias con anti inflamatorios no esteroideos en los últimos seis meses anteriores al estudio. Los pacientes, una vez informados y luego de explicarles el diseño del estudio y los alcances del mismo, procedieron a firmar la hoja de consentimiento para su participación en el estudio. Se tomaron las muestras en las piezas dentarias antero-superiores de acuerdo al Índice gingival de Ramfjord las piezas dentarias seleccionadas.

Toma de muestras

Se realizó la toma de las muestras del GCF de las piezas dentarias. La pieza dentaria seleccionada se aisló relativamente, es decir colocando rollos de algodón en el fondo del surco, y luego secando con rollos de algodón la pieza dentaria y los dientes vecinos. Seguidamente, la muestra fue recolectada a nivel de la cara vestibular -tercio mesial- o distal- de la pieza dentaria con la técnica de microdiálisis. Para ello se colocó una microcánula recta (Meridialysis Mérida-Venezuela) a nivel del surco gingival; la micro cánula fue colocada a 1.5mm. aproximadamente del fondo del surco y se dejó allí, fijándola con cinta adhesiva al diente, durante tres minutos. Se procedió a tomar cinco muestras de cada pieza dentaria, recolectando 0.5 l en un tiempo de 30 seg. La microcánula estaba conectada a la bomba de perfusión la cual inyectó solución isotónica de cloruro de sodio a un flujo de perfusión de 1 μ l/min. El dializado fue recogido en un microtúbulo hecho a partir de un tubo de hematocrito. El conjunto de diez muestras de cada paciente fueron almacenadas a -70 C, hasta completar el total de las 100 muestras a analizar.

Procedimiento de microdiálisis.

La sonda de microdiálisis fue construida con un tubo de acero inoxidable y un tubo de celulosa con perforaciones de 13000 MW, un capilar de sílica fundida de 10 cms. x 76 μ m I.D. x 150 m O.D. fue insertado dentro de los tubos de celulosa y de acero inoxidable (23). La longitud efectiva de la pieza de diálisis fue de 2 mm. La entrada de la sonda fue conectada a una jeringa que contenía solución isotónica de cloruro de sodio (Cloruro de sodio USP 0.90 g., Agua 18 M Ω obtenida de un MilliQ inyectable c.s.p. 100 ml, Concentración electrolítica Na 154 mEq/L, Osmolaridad 308 mOsm/L).

Procedimiento de derivatización

Las muestras fueron mezcladas con 0.5 l de la solución derivatizante hecha de buffer carbonato 20 mM a un pH de 9.5 e isotiocianato de fluoresceína isómero I (F.I.T.C.) 4×10^{-6} M a una proporción de 1:1. Seguidamente la mezcla se centrifugó y se dejó en un sitio oscuro por lo menos durante 18 hrs para permitir la reacción de los aminoácidos con el FITC. Posteriormente cada vial que contenía la muestra fue diluido en 5 μ l de agua desionizada e igualmente centrifugada. Los estándares de aspartato y glutamato fueron derivatizados con el mismo procedimiento.

Procedimiento de medición en el aparato de electroforesis capilar.

La detección del aspartato y glutamato fue realizada utilizando el Instrumento R2D2-1 CZE-LIFD (Meridialysis, Mérida, Venezuela) el cual está equipado con un capilar de sílica fundida de 60 cms. de longitud, de diámetro externo 350 μ m y de diámetro interno 25 μ m. Las muestras y los estándares de aspartato y glutamato fueron inyectados hidrodinámicamente en la parte terminal anódica del capilar por efecto de una presión negativa de 19 p.s.i. aplicada durante 200 mseg. en la parte terminal catódica del capilar. Luego fueron aplicados 21 kV entre los dos extremos del capilar. El voltaje generó una corriente de 7 μ A. Después de correr la muestra, el capilar fue lavado con NaOH 1M por 1 min. Luego con agua de 18 M Ω durante 1 min. y por último con el buffer de carbonato por 2 mins.

En el electroferograma de cada muestra fueron identificados el glutamato y el aspartato por el tiempo de migración y por la altura de la espiga. La presencia de estos aminoácidos fue comprobada realizando el "spiking" del aspartato y el glutamato. Una vez corridas todas las muestras por electroforesis capilar se determinó la altura de los picos o espigas y se calculó la concentración por comparación con las soluciones estándar.

Análisis estadístico

Estadística descriptiva de los sujetos de estudio. Se usó ANOVA de los programas estadísticos SPSS 8.0 y del GraphPad Prism para Windows para comparar la relación de glutamato y aspartato.

RESULTADOS

Las características clínicas de las piezas afectadas y los controles se dan en la tabla 1. Luego de procesadas las muestras para su lectura por electroforesis capilar, se pudieron observar en el electroferograma de cada muestra la presencia de los dos aminoácidos objetos de este estudio, el aspartato y el glutamato (Figura 1).

Tabla 1
Características de las piezas dentales con PCIP y de las piezas con GIP

	Piezas con PCIP	Piezas con GIP
1 Profundidad del surco (promedio ± error estándar)	4-5 mm ± 0,4	4 1-2 mm ± 0,5
2 Pérdida de la inserción clínica (promedio ± error estándar)	3,8 mm ± 0,45	0,8 mm ± 0,25
3 Porcentaje sitios con placa (%)	65	65
4 Porcentaje de sitios con sangramiento (%)	30	0

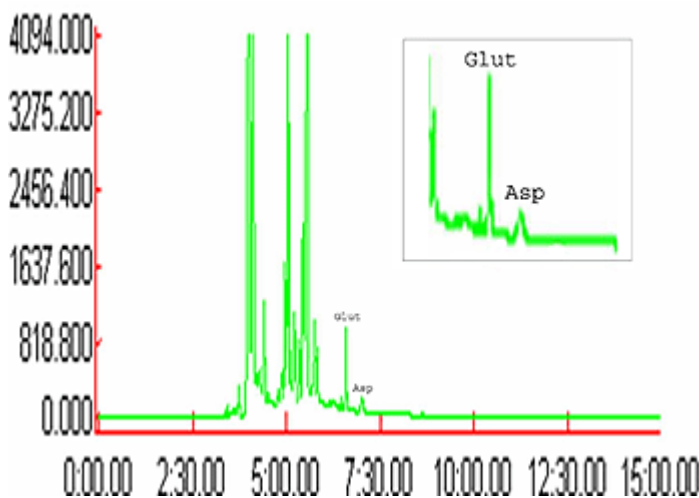


Figura 1

Electroferograma de una muestra de GCF de un diente con GIP. En el recuadro superior derecho se puede apreciar a mayor aumento el glutamato (Glut) y el aspartato (Asp). Eje Y: microvoltios (mV); eje X: tiempo (min).

El glutamato disminuyó ($p < 0.05$) en las muestras de dientes con PCIP comparado los dientes con GIP (Figura 2). La concentración basal del glutamato en los dientes con GIP fue de 11.23 M.

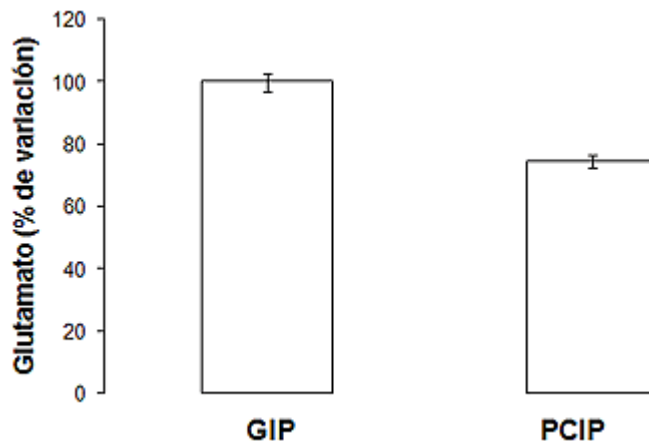


Figura 2

El glutamato disminuyó (<0.05) en las muestras de dientes con PCIP, comparados con los dientes con GIP

El aspartato aumentó ($p<0.02$) en las muestras de los dientes con PCIP comparados con los dientes con GIP (Figura 3). La concentración basal del aspartato en los dientes con GIP fue de 4.38 μ M.

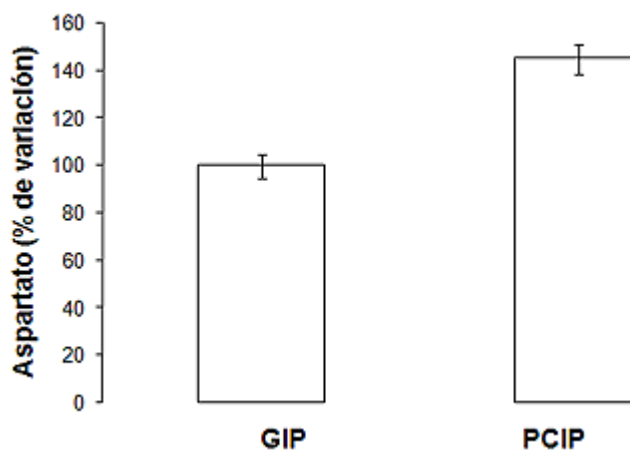


Figura 3

El aspartato aumentó (<0.02) en las muestras de dientes con PCIP, comparados con los dientes con GIP

DISCUSION

En el presente trabajo se observó la presencia del glutamato y del aspartato en el fluido gingival de pacientes con GIP y con PCIP, estos aminoácidos presentaron niveles de concentración diferentes en ambas condiciones clínicas. Los resultados indican que estos aminoácidos no son catalizados en igual proporción en las piezas dentarias con PCIP, ya que el porcentaje de variación del glutamato fue menor que el porcentaje de variación del aspartato. Estos hallazgos pueden deberse a diferentes factores. Las bacterias patógenas periodontales, tales como *P. gingivalis* y *F. nucleatum*, utilizan el glutamato en reacciones de biosíntesis para formar entre otras especies metabólicas (24). Las reacciones desde el glutamato hasta la ornitina no ocurren en los tejidos de los mamíferos sino a nivel bacteriano (25). Por otra parte la *P. gingivalis* y el *F. nucleatum* utilizan el glutamato para generar energía. El grupo carboxílico (COO) de este aminoácido sufre degradación oxidativa (pierden electrones) para entrar al ciclo de Krebs y generar energía bajo la forma de ATP (26). Las bacterias pueden metabolizar los aminoácidos por un proceso de transaminación entre un aminoácido y un cetoácido. De esta manera el glutamato y el aspartato experimentan este proceso de manera reversible para formar α -cetoglutarato y oxalacetato, respectivamente. Esta reacción ocurre de igual manera en los demás seres vivos con la diferencia que en las bacterias la enzima que lleva a cabo este proceso es la fosfato piridoxal transaminasa. Además, los amino ácidos en las bacterias pueden ser metabolizados por un

proceso de desaminación oxidativa del aminoácido tal como ocurre con el glutamato <-> α -iminoglutarato <-> α -cetoglutarato.

La diferencia en los porcentajes de variación del glutamato y aspartato en los dientes enfermos periodontalmente puede deberse, entre otras causas, al hecho de que las bacterias utilizan el glutamato para sintetizar aminoácidos y para obtener energía. Esto explicaría la disminución de glutamato pero no explicaría el aumento del aspartato. Las piezas dentarias con PCIP tienen un pH de 7.25 - 7.5 y una temperatura de 37.5 C. Estos parámetros son diferentes a los de una pieza dentaria con GIP; con relación al cambio de pH y temperatura, la literatura nos indica que las desviaciones que se hagan a las condiciones óptimas de pH y temperatura para una enzima, resultan en una reducción de la actividad enzimática (26). Otros estudios indican que para medir la AST del suero de humanos en condiciones óptimas, el pH debe ser de 7.8 y la temperatura de 30 C. La AST en el medio extracelular de las piezas dentarias con PCIP, las cuales tienen una temperatura mayor de 37 C, cataliza lentamente la conversión del aspartato y α -cetoglutarato en oxalacetato y glutamato o inversamente la conversión de glutamato y oxalacetato en -cetoglutarato y aspartato (2).

Los resultados de la presente investigación, niveles elevados de aspartato y niveles bajos de glutamato en dientes con PCIP, se pueden explicar si se asume que la enzima AST está catalizando principalmente la conversión de glutamato oxalacetato en aspartato α -cetoglutarato, lo cual disminuiría la concentración de glutamato y aumentaría la de aspartato.

CONCLUSION

La técnica de microdiálisis permite recolectar muestras de GCF de una forma sencilla e indolora para el paciente, y el microanálisis por electroforesis capilar permitió medir el glutamato y el aspartato. En los microdializados del GCF de piezas dentarias con PCIP se encontró una disminución del glutamato y un aumento del aspartato estadísticamente significativas en comparación con las piezas dentarias con GIP.

BIBLIOGRAFIA

1. Uitto V-J. Gingival crevicular fluid-an introduction. *Periodontology* 2000; 2003;31:9-11.
2. Carranza F. y Newman M. 1998. *Periodontología Clínica*. Editorial Interamericana. México.
3. Nakashima K., Demeurisse C., Cimasoni G. The recovery efficiency of various materials for sampling enzymes and polymorphonuclear leukocytes from gingival crevices. *J. Periodontology* 1994; 21: 479-483.
4. Eley B. y Cox S. Advances in periodontal diagnosis 9. Potencial markers of cell death and tissue degradation. *British Dental Journal*. 1998, 184(9): 427-430.
5. Kamma J.J., Nakou M., Persson R.G. J. Association of early onset periodontitis microbiota with aspartate amino transferase activity in gingival crevicular fluid. *Clin Periodontol*. 2001, 28 : 1096-1105.
6. Shimada K., Mizuno T., Uchida T., Kato T., Ito K., Murai S. Relationship between levels of aspartate aminotransferase in gingival crevicular fluid and conventional measures of periodontal status assessed using PocketWatch TM : A cross -sectional study. *J. Oral Sci*. 1999; 41: 35-40.
7. O'Brien T.; Roszkowski M., Wolff L., Hinrichs J., Hargreaves K. 1996. Effect of a non-steroidal anti-inflammatory drug on tissue levels of immunoreactive prostaglandin E , Immunoreactive leukotriene, and pain after periodontal surgery. *Journal of Periodontology*. 1996, 67 :1307-1316.
8. Akalin AF., Sengun D., Eratalay K., Renda N., Çağlayan G .Hydroxyproline and total protein levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with juvenile, rapidly progressive, and adult periodontitis. *J. Periodontol*. 1993; 64: 323-329.
9. Taba M., Kinney J., Kim A.S., Giannobile W.V. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent. Clin N. Am*. 2005, 49 : 551-557.
10. Wilson T. y Kornman K.. 1996. *Fundamentals of Periodontic*. Editorial Quintessence. Singapur.

11. Mizuho F., Mori H., Deguchi S., Ogawa Y., Hori T. Aspartate amino transferase (AST) levels in human periodontium-derived cells. *J. Periodontol.* 1996; 67: 733-736.
12. Voet D. y Voet J.. 1995. *Biochemistry*. 2ª ed. Editorial John Wiley y Sons, New York.
13. Waddington R.J., Embery G., Smith A.J. Immunochemical detection of the proteoglycans decorin and biglycan in human gingival crevicular fluid from sites of advanced periodontitis. *Arch. Oral Biol.* 1998; 43: 287-295.
14. Syrjänen SM., Alakuijala L., Alakuijala P., Markkanen SO., Markkanen H. Free amino acid levels in oral fluids of normal subjects and patients with periodontal disease. *Arch. Oral Biol.* 1990, 35: 189-193.
15. Persson G.R., De Rouen T.A., Page R.C. Relationship between levels of aspartate aminotransferase in gingival crevicular fluid and gingival inflammation. *J. Periodont. Res.* 1990, 25: 17-24.
16. Persson G.R., De Rouen T.A., Page R.C. Relationship between gingival crevicular fluid levels of aspartate aminotransferase and active tissue destruction in treated chronic periodontitis patients. *J. Periodont. Res.* 1990, 25: 81-87.
17. Chambers D.A., Imrey P.B., Cohen R.L., Crawford J.M., Alves M.E.AF., McSwiggin T.A. A longitudinal study of aspartate aminotransferase in human gingival crevicular fluid. *J. Periodont. Res.* 1991, 26: 65-74.
18. Maggnusson I., Persson R., Page R., DeRouen T., Crawford J., Cohen R., Chambers D., Alves M., Clark W. A multi-center clinical trial of a new chairside test in distinguishing between diseased and healthy periodontal sites. II. Association between site type and test outcome before and after therapy. *J. Periodont.* 1996, 67: 589-596.
19. Wong M., Lu Ch., Liu Ch., Hou I., Chang W. Relationship of the subgingival microbiota to a chairside test for aspartate aminotransferase in gingival crevicular fluid. *Journal of Periodontology.* 1999, 70(1):57-62.
20. Marsh P. y Martin M. 1992. *Oral Microbiology*. 3ra ed. Editorial Chapman y Hall. Londres.
21. Greinstein y Caton. Periodontal disease activity. A critical assessment. *J Periodontol.* 1990, 61: 543-552.
22. Johnson N. Crevicular fluid-based diagnostic tests. *Current Opinion in Dentistry* 1999, 1: 52-65.
23. Hernandez L.; Stanley B.; Hoebel B... A small removable microdialysis probe. *Life Science.* 1986, 39: 2629-2677.
24. Murray R., Granier D., Mayes P., Rodwell V. 1977 *Bioquímica de Harper*. Editorial El manual moderno. México.
25. Pelczar M., Reid R., Chan E. *Microbiología*. 4ª edición. Editorial McGraw Hill, Mexico.
26. Bergmeyer H.U., Scheibe P., Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase *Clin. Chem.* 1978 Jan; 24(1):58-73.