

SIdP

**Società Italiana
di Parodontologia
e Implantologia**

Concentrazione di metalloproteinasi-8 nel fluido sulcolare perimplantare. Studio trasversale su tessuti sani e affetti da complicazioni biologiche

Giorgia Mariotti¹, Erica Giulianelli², Marco Moscatelli¹, Michele Nieri³, Umberto Pagliaro⁴, Mauro Merli⁵, Michael Karpisek⁶, Stefan Stübinger⁷

¹Odontoiatra, Libero professionista, Rimini

²Igienista Dentale, Libero professionista, Rimini

³Odontoiatra, Dipartimento di Chirurgia e Medicina Traslazionale, Università di Firenze

⁴Medico Odontoiatra, Libero professionista, Firenze

⁵Medico Odontoiatra, Libero professionista, Rimini

⁶Dottore di Ricerca in Scienze Molecolari, Libero professionista, Brno

⁷Medico Odontoiatra, Dipartimento di Biotecnologie Applicate e Medicina Molecolare, Università di Zurigo

SIdP - Atti della Sessione di ricerca Premio H.M. Goldman - Rimini, 14 marzo 2014

RIASSUNTO

Obiettivi: 1. Comparare la concentrazione di metalloproteinasi-8 attiva (aMMP-8) del fluido sulcolare perimplantare nel caso di perimplantite, mucosite e tessuti sani. 2. Selezionare, sulla base di una curva ROC, un valore della concentrazione di aMMP-8 in grado di discriminare la perimplantite dalle altre condizioni. 3. Correlare la concentrazione di aMMP-8 sulcolare con quella salivare. **Materiali e metodi:** Lo studio epidemiologico trasversale ha riguardato 60 pazienti suddivisi in 3 gruppi. Sono stati selezionati 20 impianti con perimplantite, 20 impianti con mucosite e 20 impianti con tessuti sani. **Risultati:** Le mediane delle concentrazioni di aMMP-8 sulcolare sono state 38.5 ng/mL nella perimplantite, 9.0 ng/mL nella mucosite e 4.5 ng/mL negli impianti con tessuti sani ($P = 0.0020$). La differenza stimata tra le mediane del gruppo di perimplantite e quello dei tessuti sani è stata di 31 ng/mL (CI95%: 7; 54 ng/mL; $P = 0.0014$). L'area sotto la curva ROC (AUC) è stata 0.74 (CI95%: 0.61; 0.85). La soglia selezionata è stata 11 ng/mL. Il coefficiente di correlazione tra il logaritmo di aMMP-8 sulcolare e il logaritmo di aMMP-8 salivare è risultato 0.37. **Conclusioni:** La concentrazione di aMMP-8 sulcolare è più alta in caso di perimplantite rispetto alla situazione di tessuto sano perimplantare.

INTRODUZIONE

Le metalloproteinasi della matrice sono enzimi che decompongono vari elementi della matrice extracellulare (Nagase e Woessner 1999).

La metalloproteinasi-8 (MMP-8) è un indicatore importante della decomposizione tissutale ed è presente in caso di parodontite nella gengiva e nel fluido sulcolare (Ingman et al. 1996). Studi recenti hanno mostrato che la concentrazione di MMP-8 nel fluido sulcolare di pazienti affetti da parodontite cronica o aggressiva è più alta rispetto a quella riscontrata in pazienti sani (Han et al. 2012, Khongkhunthian et al. 2012). La MMP-8 è risultata anche correlata in modo significativo con l'indice di gengivite, l'indice di placca, il sondaggio ed il livello di attacco clinico (Khongkhunthian et al. 2012). Per questo motivo la concentrazione di MMP-8 nel fluido sulcolare potrebbe costituire un indice utile per monitorare l'attività della parodontite ed essere utilizzato per predire la progressione della malattia (Mäntylä et al. 2006).

Pochi studi hanno valutato la concentrazione di MMP-8 nel fluido sulculare perimplantare (Nomura et al. 2000, Kivelä-Rajamäki et al. 2003, Basegmez et al. 2012).

I pazienti con parodontite hanno presentato concentrazioni elevate di MMP-8 salivare rispetto ai pazienti con gengivite e tessuti sani (Miller et al. 2006, Rai et al. 2008, Gursoy et al. 2010, Rathnayake et al. 2013). In un recente studio, tra vari indicatori salivari, la MMP-8 è stata l'unica in grado di discriminare i soggetti con marcata perdita di osso alveolare rispetto ai soggetti con piccola perdita di osso alveolare (Gursoy et al. 2013). In un altro studio, la concentrazione salivare di MMP-8 è stata significativamente ridotta nei pazienti che avevano risposto favorevolmente alla terapia parodontale rispetto a quelli che non avevano risposto favorevolmente e l'analisi della curva ROC ha evidenziato per la MMP-8 l'area sotto la curva (AUC) più elevata se confrontata a quella degli altri indicatori salivari (Sexton et al. 2011). Questi risultati hanno evidenziato che i livelli salivari di MMP-8 potrebbero avere un alto potenziale diagnostico per la parodontite (Ebersole et al. 2013).

Nel caso delle malattie perimplantari non è chiaro quale potrebbe essere il rapporto tra livelli sulculari e salivari di MMP-8.

Gli obiettivi di questo studio sono stati: 1. Comparare la concentrazione di metalloproteinasi-8 attiva (aMMP-8) del fluido sulculare perimplantare in caso di perimplantite, mucosite e tessuti sani. 2. Selezionare, sulla base di una curva ROC, un valore nella concentrazione di aMMP-8 in grado di discriminare la perimplantite dalle altre condizioni. 3. Correlare la concentrazione di aMMP-8 sulculare con quella salivare.

Quest'articolo è stato scritto in accordo con lo STROBE, un metodo messo a punto per riferire gli studi osservazionali in epidemiologia (Vandenbroucke et al. 2007).

MATERIALI E METODI

Disegno dello studio

Si tratta di uno studio epidemiologico trasversale su 3 gruppi di pazienti.

Setting

Lo studio è stato eseguito in una struttura privata a Rimini (Italia). Gli investigatori hanno illustrato ai pazienti la natura, gli obiettivi e i metodi dello studio enfatizzando i potenziali pericoli e i disagi che la partecipazione ad esso avrebbe potuto comportare. I pazienti hanno ricevuto un documento nel quale si spiegavano la natura e le finalità dello studio e hanno firmato un consenso informato per la partecipazione.

Partecipanti

I criteri d'inclusione erano: età \geq 18 anni, presenza di almeno un impianto dentale in titanio.

I criteri di esclusione erano: gravidanza o allattamento, utilizzo di sostanze stupefacenti, malattie in fase acuta (per esempio: febbre, mal di gola, diarrea), presenza d'inflammatione della mucosa orale (per esempio: presenza di afte, lichen planus, ferite orali, leucoplachia, carcinomi orali).

I pazienti hanno risposto a un questionario a cui è seguita un'indagine anamnestica, clinica ed eventualmente radiologica. A questa fase è seguito il tampone salivare e la raccolta di liquido sulculare perimplantare effettuata in corrispondenza di 4 siti selezionati. L'esame del cavo orale ha compreso l'analisi di indici parodontali e perimplantari come il sondaggio degli impianti selezionati, il *Full Mouth Plaque Score* (FMPS) e il *Periodontal Screening and Recording* (PSR).

Tampone salivare

La saliva è stata raccolta utilizzando un tampone assorbente, il *Salimetric Oral Swab* (SOS) (Salimetrics Europe Ltd., Acorn Business Centre, Oaks Drive, Newmarket, Suffolk CB8 7SY, Great Britain). Il SOS è costituito da un polimero inerte non tossico a forma di cilindro di 30x10 mm. Per evitare di contaminare la saliva con altre sostanze è stato vietato al paziente di effettuare

sedute odontoiatriche nelle 48 ore precedenti la raccolta salivare e di consumare pasti, lavarsi i denti, assumere caffè o alcol nei 45 minuti precedenti la raccolta di saliva.

Dieci minuti prima della raccolta salivare i pazienti sciacquavano la bocca con acqua per rimuovere eventuali residui.

Il SOS è stato collocato nel fornice superiore destro e lasciato *in situ* per 5 minuti. I campioni sono stati mantenuti a 4°C per un massimo di 2 ore prima di essere congelati a -20°C.

I campioni di saliva SOS sono stati centrifugati a temperatura ambiente per 20 minuti e analizzati utilizzando il kit sandwich ELISA per l'aMMP-8 (Biovendor-Laboratori medicina, Brno, Czech Republic).

Raccolta di fluido sulcolare perimplantare

Il fluido sulcolare è stato raccolto dal solco perimplantare utilizzando delle strisce assorbenti (5-GCF/PISF strips, Dentognostics GmbH, Jena, Germany) (Mäntylä et al. 2003). Le strisce sono state collocate in fondo al solco perimplantare e lasciate *in situ* per 30 secondi.

Una volta completata questa fase, le strisce sono state collocate in una soluzione tampone, seguendo le istruzioni del fabbricante. Tutte le procedure sono state effettuate da un singolo operatore (EG).

L'operatore ha raccolto 4 diversi campioni da 4 diversi siti perimplantari. Soltanto il campione proveniente dal sito con le peggiori condizioni cliniche è stato selezionato per le successive analisi. Solo dopo la raccolta del fluido sulcolare è stato eseguito il sondaggio parodontale. Infatti, il sito da campionare non dovrebbe essere contaminato in nessun modo dal sondaggio o da altre procedure diagnostiche o terapeutiche prima della raccolta sulcolare.

Le strisce sono state conservate a 2-8 °C prima di essere analizzate quantitativamente per l'aMMP-8 dal laboratorio (Dentognostics GmbH, Jena, Germany).

Assegnazione dei pazienti ai gruppi

I pazienti sono stati assegnati a uno dei tre gruppi (mucosite, perimplantite, sani). In accordo con le indicazioni del "*Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology*" (Lang e Berglundh 2011) i principali criteri diagnostici erano il sanguinamento a seguito di un leggero sondaggio (< 0.25 N) e il sondaggio (PPD). I pazienti con un impianto con PPD \geq 5 mm, sanguinamento e/o suppurazione e osso perduto sono stati assegnati al gruppo "perimplantite"; i pazienti con un impianto che presentava PPD < 5 mm, sanguinamento al sondaggio senza osso perduto sono stati assegnati al gruppo "mucosite"; i pazienti con un impianto con PPD < 5 mm senza sanguinamento al sondaggio e senza osso perduto sono stati assegnati al gruppo "sani". Il liquido sulcolare è stato raccolto da quattro siti perimplantari per ogni paziente, ma poi è stato analizzato solo il campione proveniente dal sito con le peggiori condizioni cliniche. Quindi, solo un sito per paziente è stato monitorato per la concentrazione di aMMP-8. Il sondaggio è stato effettuato dopo la raccolta del liquido sulcolare.

Controllo dei potenziali bias

I tecnici di laboratorio erano in cieco rispetto all'assegnazione dei pazienti ai 3 gruppi.

Calcolo della dimensione campionaria

Per individuare una differenza tra i gruppi di 10 ng/mL utilizzando la deviazione standard di 10.7 ng/mL (Ehlers et al. 2011) con una significatività del 5% a due code e una potenza dell'80%, erano necessari 60 pazienti (20 per gruppo).

Analisi statistica

La statistica descrittiva ha utilizzato la media e la deviazione standard per le variabili quantitative e la frequenza e percentuale per le variabili qualitative. Per la concentrazione di aMMP-8 è stata utilizzata anche la mediana e gli intervalli interquartile.

Il test di Kruskal-Wallis è stato effettuato considerando i 3 gruppi come variabile esplicativa e la

concentrazione sulculare di aMMP-8 come variabile risposta. Le comparazione *post-hoc* tra due gruppi sono state effettuate con il test Steel-Dwass, utilizzando lo stimatore di Hodges-Lehmann per la differenza tra le mediane e i relativi intervalli di confidenza.

La curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) è stata utilizzata sulla base della concentrazione sulculare di aMMP-8 per discriminare la condizione di perimplantite da quelle di mucosite o impianto sano. È stata stimata l'area sotto la curva ROC (AUC) con i relativi intervalli di confidenza. La soglia della concentrazione di aMMP-8 sulculare per discriminare la condizione di perimplantite è stata scelta massimizzando l'indice di Youden. Sono stati calcolati gli intervalli di confidenza della sensibilità e della specificità per la soglia selezionata.

Una regressione lineare è stata eseguita per correlare il logaritmo naturale della concentrazione sulculare di aMMP-8 con il logaritmo naturale della concentrazione di a-MMP-8 salivare.

Un'analisi secondaria ed esplorativa è stata effettuata utilizzando due regressioni *stepwise*, *forward* e *backward*. La variabile risposta era costituita dal logaritmo naturale della concentrazione di aMMP-8 sulculare. Potenziali variabili predittive erano rappresentate da: genere, età, fumo, consumo di alcol, consumo di caffè, assunzione di farmaci, esame pomeridiano o mattutino, numero d'impianti presenti, posizione dell'impianto in esame (mascellare o mandibolare), numero di anni dall'inserzione, siti interprossimali o vestibolari/linguali, diagnosi dell'impianto (perimplantite, mucosite, sano), profondità di sondaggio del sito perimplantare, sanguinamento del sito, *full mouth plaque score* (FMPS), *full mouth bleeding score* (FMBS), parodontite (sestante con massimo PSR \geq 3 versus sestante con massimo PSR $<$ 3).

RISULTATI

Statistica descrittiva

Le frequenze e percentuali dei 3 gruppi sono mostrate in Tabella 1. L'assunzione dei farmaci era meno frequente nel gruppo della mucosite, mentre siti interprossimali e impianti superiori erano meno frequenti nel gruppo dei sani.

Le medie e le deviazioni standard dei 3 gruppi sono riportate in Tabella 2. È risultata poca differenza tra i 3 gruppi per quanto riguarda età, numero d'impianti, anni dall'inserzione, FMPS, FMBS. La concentrazione di aMMP-8 appare maggiore per il gruppo perimplantite (Tabella 2, Figura 1).

Tabella 1. Statistica descrittiva. Frequenza (percentuale)

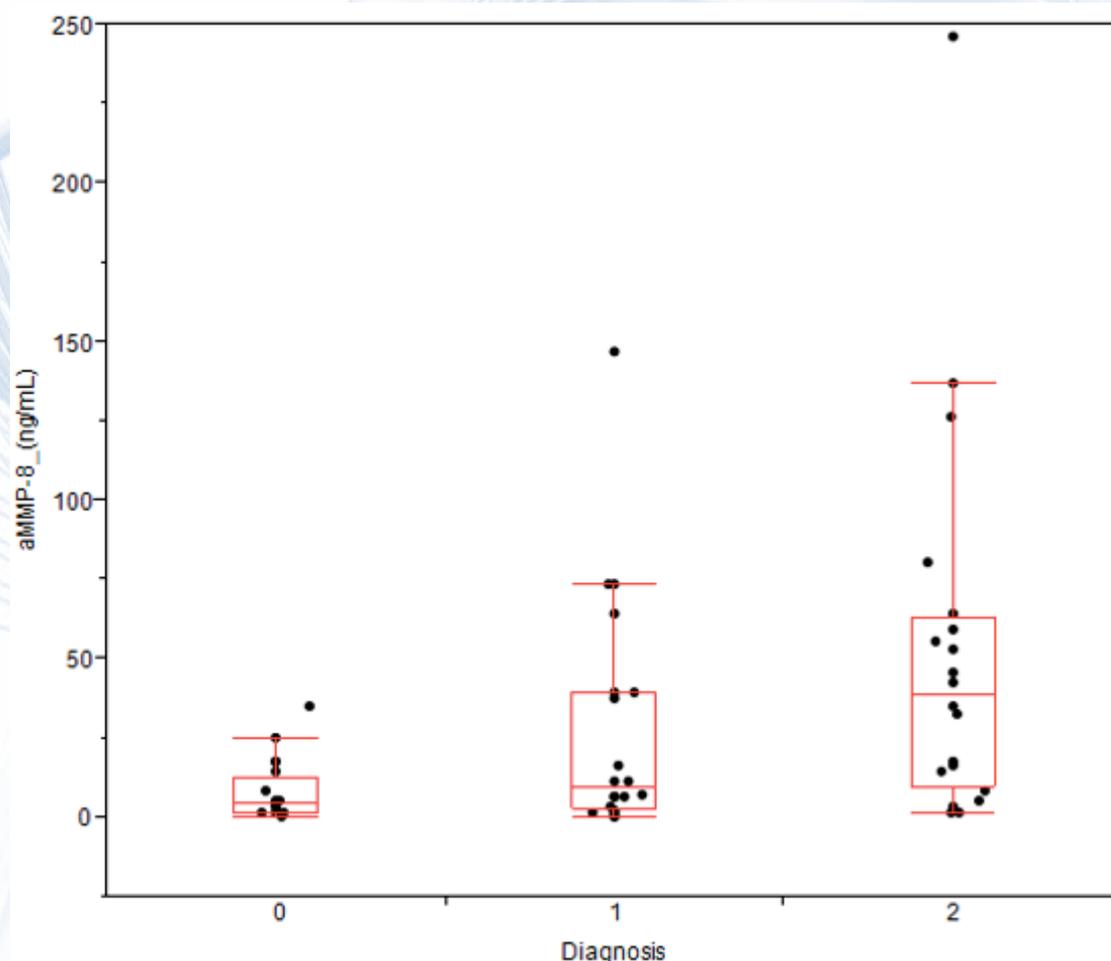
Variabile	Sani N=20	Mucosite N=20	Perimplantite N=20
Femmine	12 (60)	15 (75)	11 (55)
Fumatori	3 (15)	3 (15)	7 (35)
Alcol	10 (50)	9 (45)	12 (60)
Caffè	17 (85)	17 (85)	19 (95)
Farmaci	12 (60)	6 (30)	14 (70)
Esame pomeridiano	8 (40)	10 (50)	6 (30)
Mascellare superiore	7 (35)	12 (60)	16 (80)
Sito interprossimale	10 (50)	16 (80)	18 (90)
Parodontite	16 (80)	20 (100)	20 (100)

Tabella 2. Statistica descrittiva. Media (deviazione standard)

Variabile	Sani N=20	Mucosite N=20	Perimplantite N=20
Età	61.6 (10.0)	56.2 (11.8)	61.3 (9.3)
Numero di impianti	4.3 (2.9)	3.5 (2.6)	4.6 (3.6)
Anni dall'inserzione	5.7 (6.4)	6.3 (5.5)	7.9 (6.1)
FMPS	33.8 (22.7)	38.2 (13.6)	43.4 (23.7)
FMBS	28.8 (13.2)	25.2 (8.8)	32.4 (17.4)
Concentrazione salivare aMMP-8 (ng/mL)	67.0 (92.3)	132.3 (163.1)	127.4 (175.1)
Concentrazione sulculare aMMP-8 (ng/mL)	7.6 (9.4)	27.1 (37.5)	51.9 (59.8)
Concentrazione sulculare aMMP-8 (ng/mL) Med (Int)	4.5 (1.0; 12.5)	9.0 (2.2; 39.0)	38.5 (9.5; 62.7)

Legenda. aMMP-8: metalloproteinasi-8 attiva; Med (Int): Mediana (Intervallo interquartile).

Figura 1. Confronto delle concentrazioni di aMMP-8 nel fluido sulculare perimplantare



Legenda. aMMP-8: metalloproteinasi-8 attiva; 0: Sani; 1: Mucosite; 2: Perimplantite.

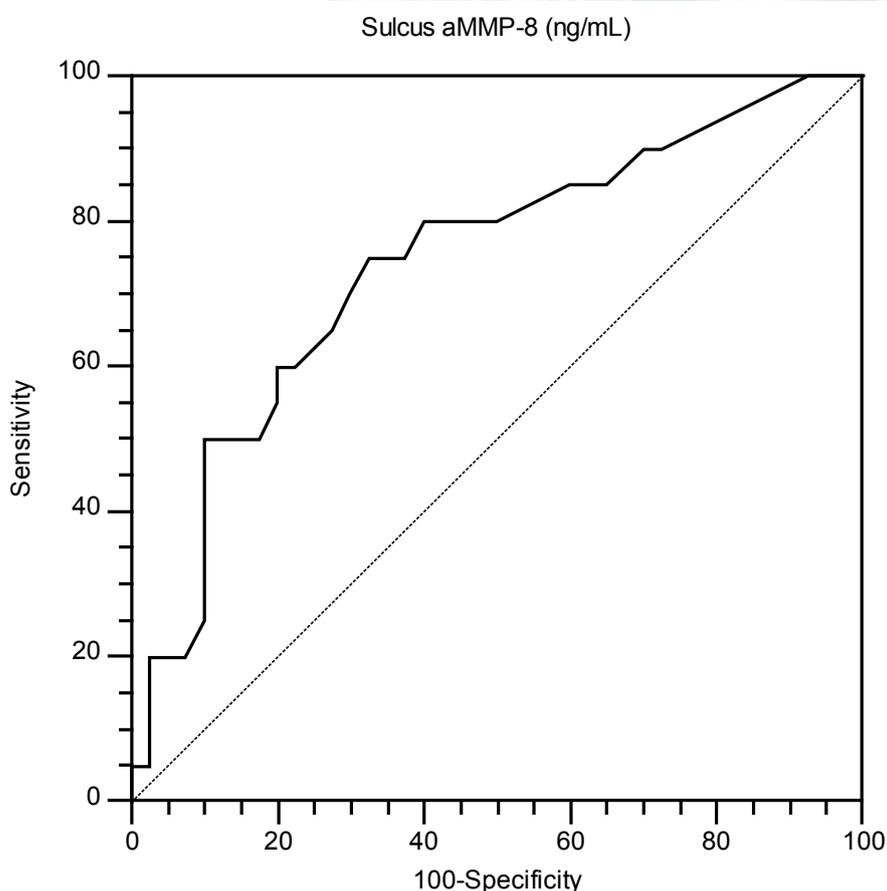
Confronto delle concentrazioni di aMMP-8 nel fluido sulculare perimplantare

La differenza tra i 3 gruppi è risultata significativa ($P = 0.0020$, Kruskal-Wallis test) (Figura 1). La differenza stimata tra le mediane del gruppo della perimplantite e del gruppo degli impianti sani è stata di 31 ng/mL (CI95%: 7; 54 ng/mL; $P = 0.0014$, Steel-Dwass test); la differenza stimata tra le mediane del gruppo della perimplantite e del gruppo della mucosite è stata di 14 ng/mL (CI95%: -5; 48 ng/mL; $P = 0.1929$, Steel-Dwass test); la differenza stimata tra le mediane del gruppo della mucosite e del gruppo degli impianti sani è stata di 5 ng/mL (CI95%: -1; 34 ng/mL; $P = 0.1807$, Steel-Dwass test).

Curva ROC per la concentrazione di aMMP-8 nel fluido sulculare perimplantare

La curva ROC per la concentrazione di aMMP-8 nel fluido sulculare perimplantare per discriminare tra perimplantite e mucosite/impianto sano è mostrata in Figura 2. L'area sotto la curva (AUC) è risultata 0.74 (CI95%: 0.61; 0.85). La soglia della concentrazione di aMMP-8 associata alla massimizzazione dell'indice di Youden è stata di 11 ng/mL. Considerando questa soglia, la sensibilità è stata del 75% (CI95%: 51%; 91%) e la specificità è stata del 68% (CI95%: 51%; 81%).

Figura 2. Curva ROC per la concentrazione di aMMP-8 nel fluido sulculare perimplantare per discriminare tra perimplantite e mucosite/impianto sano



Legenda. ROC: Receiver Operating Characteristic; aMMP-8: metalloproteinasi-8 attiva.

Regressione della concentrazione di aMMP-8 salivare rispetto alla concentrazione di aMMP-8 sulculare

La regressione del logaritmo della concentrazione salivare di aMMP-8 rispetto al logaritmo della concentrazione di aMMP-8 sulculare è mostrata in Tabella 3 e in Figura 3. L' R^2 è risultato 0.14 e il P-value è stato 0.0038. Il coefficiente di correlazione tra i due logaritmi è stato di + 0.37.

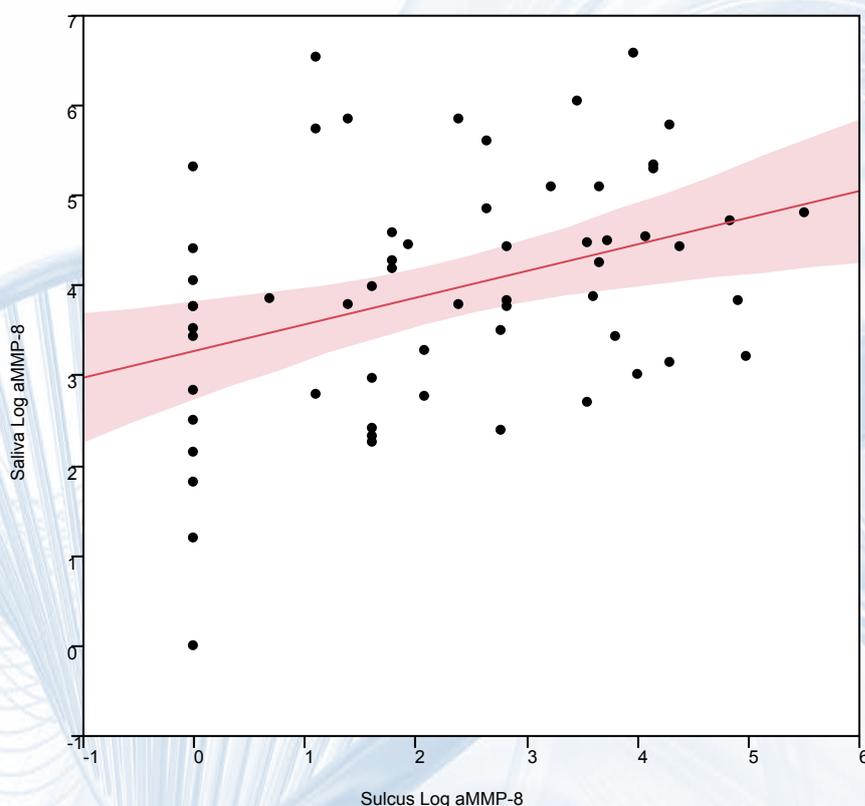
Tabella 3. Stima dei parametri della regressione del logaritmo della concentrazione salivare di aMMP-8 rispetto al logaritmo della concentrazione di aMMP-8 sulculare
 $R^2=0.14$

$$\text{Salivary Log aMMP-8} = 3.28 + 0.30 \text{ Sulcus Log aMMP-8}$$

Termine	Stima	Errore Standard	P-Value
Intercep	3.28	0.27	
Log aMMP-8	0.30	0.10	0.0038

Legenda. aMMP-8: metalloproteinasi-8 attiva; Log: logaritmo naturale

Figura 3. Regressione del logaritmo della concentrazione salivare di aMMP-8 rispetto al logaritmo della concentrazione di aMMP-8 sulculare



Legenda. aMMP-8: metalloproteinasi-8 attiva; Log: logaritmo.

Regressione stepwise per il logaritmo della concentrazione di aMMP-8 nel fluido sulculare peri-implantare

Le regressioni *stepwise forward* e *backward* per il logaritmo della concentrazione di aMMP-8 nel fluido sulculare hanno ottenuto lo stesso risultato che è mostrato in Tabella 4. L' R^2 è risultato 0.54. PD, FMBS ed esame pomeridiano sono stati positivamente associati al logaritmo della concentrazione di aMMP-8 del fluido sulculare, mentre l'età è stata negativamente associata ai livelli di aMMP-8.

Tabella 4. Stima dei parametri della regressione stepwise per il logaritmo della concentrazione di aMMP-8 nel fluido sulculare

$R^2 = 0.54$

$\text{Sulcus Log aMMP-8} = 1.73 - 0.04 \text{ Et\`a} + 0.90 \text{ Esame pomeridiano} + 0.43 \text{ PD} + 0.03 \text{ FMBS}$

Termine	Stima	Errore Standard	P-Value
Intercept	1.73	1.02	
Et\`a	-0.04	0.01	0.0047
Esame pomeridiano	0.90	0.31	0.0055
PD	0.43	0.08	<0.0001
FMBS	0.03	0.01	0.0043

Legenda. aMMP-8: metalloproteinasi-8 attiva; Log: logaritmo naturale; PD: profondit\`a di sondaggio; FMBS: Full-Mouth Plaque Score.

CONCLUSIONI

1. In accordo con i pochi dati presenti in letteratura (Nomura et al. 2000, Kivel\`a-Rajam\`aki et al. 2003), la concentrazione di aMMP-8 nel fluido sulculare perimplantare \`e pi\`u elevata in caso di perimplantite rispetto al caso di impianto sano.
2. L'area sotto la curva ROC (AUC), la sensibilit\`a e la specificit\`a per la diagnosi di perimplantite sono risultate moderatamente elevate, considerando una soglia di 11 ng/mL di concentrazione di aMMP-8 nel fluido sulculare perimplantare.
3. Il logaritmo della concentrazione di aMMP-8 sulculare perimplantare e il logaritmo della concentrazione di aMMP-8 salivare sono debolmente correlati positivamente.
4. Pi\`u alte concentrazioni di aMMP-8 sulculare perimplantare sono state registrate in caso di maggiore profondit\`a di sondaggio, in soggetti giovani e in pazienti con elevato FMBS. Inoltre, la concentrazione sulculare di aMMP-8 potrebbe variare durante la giornata. Infatti, pi\`u alte concentrazioni sono state registrate negli esami pomeridiani.

Ringraziamenti

La ricerca che ha portato a questi risultati ha ricevuto fondi dall' Unione Europea (European Union's Seventh Framework Programme managed by REA-Research Executive Agency <http://ec.europa.eu/research/rea> (IFP7/2007-2013) [FP7/2007-2011]) under grant agreement n\`o [314911]).

BIBLIOGRAFIA

- Basegmez C, Yalcin S, Yalcin F, Ersanli S, Mijiritsky E. Evaluation of periimplant crevicular fluid prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-8 levels from health to periimplant disease status: a prospective study. *Implant Dent* 2012;21:306-310.
- Ebersole JL, Schuster JL, Stevens J, Dawson D 3rd, Kryscio RJ, Lin Y, Thomas MV, Miller CS. Patterns of salivary analytes provide diagnostic capacity for distinguishing chronic adult periodontitis from health. *J Clin Immunol* 2013;33:271-279.
- Ehlers V, Willershausen I, Kraft J, M\`unzel T, Willershausen B. Gingival crevicular fluid MMP-8-concentrations in patients after acute myocardial infarction. *Head Face Med* 2011;10;7:1.
- Gursoy UK, K\`on\`onen E, Pradhan-Palikhe P, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Suominen-Taipale L, Sorsa T. Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as markers of advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 2010;37:487-493.

- Gursoy UK, Könönen E, Huuonen S, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Suominen AL, Sorsa T. Salivary type I collagen degradation end-products and related matrix metalloproteinases in periodontitis. *J Clin Periodontol* 2013;40:18-25.
- Han DH, Shin HS, Paek D, Kim HD. Gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinases cross-sectionally related to periodontitis and metabolic syndrome in community Koreans. *J Clin Periodontol* 2012;39:1125-1131.
- Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, Konttinen YT, Sorsa T. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23:1127-1132.
- Khongkhunthian S, Techasatian P, Supanchart C, Bandhaya P, Montreekachon P, Thawanaphong S, Krisanaprakornkit S. Elevated levels of a disintegrin and metalloproteinase 8 in gingival crevicular fluid of patients with periodontal diseases. *J Periodontol* 2013;84:520-528.
- Kivelä-Rajamäki M, Maisi P, Srinivas R, Tervahartiala T, Teronen O, Husa V, Salo T, Sorsa T. Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-8 (collagenase-2) in diseased human peri-implant sulcular fluid. *J Periodontol Res* 2003;38:583-590.
- Lang NP, Berglundh T; Working Group 4 of Seventh European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2011;38(Suppl 11):178-181.
- Mäntylä P, Stenman M, Kinane DF, Tikanoja S, Luoto H, Salo T, Sorsa T. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J Periodontol Res* 2003;38:436-439.
- Mäntylä P. The scientific basis and development of a metalloproteinase (MMP) -8 specific chair-side test for monitoring of periodontal health and disease from gingival crevicular fluid. Academic dissertation for the degree of PhD 2006; Helsinki.
- Miller CS, King CP Jr, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc* 2006;137:322-329.
- Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491-21494.
- Nomura T, Ishii A, Shimizu H, Taguchi N, Yoshie H, Kusakari H, Hara K. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1, matrix metalloproteinases-1 and -8, and collagenase activity levels in peri-implant crevicular fluid after implantation. *Clin Oral Implants Res* 2000;11:430-440.
- Rai B, Kharb S, Jain R, Anand SC. Biomarkers of periodontitis in oral fluids. *J Oral Sci* 2008;50:53-56.
- Rathnayake N, Akerman S, Klinge B, Lundegren N, Jansson H, Tryselius Y, Sorsa T, Gustafsson A. Salivary biomarkers of oral health - a cross-sectional study. *J Clin Periodontol* 2013;40:140-7.
- Sexton WM, Lin Y, Kryscio RJ, Dawson DR 3rd, Ebersole JL, Miller CS. Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. *J Clin Periodontol* 2011;38:434-441.
- Vandenbroucke JP, von Elm E, Altman DG, Gøtzsche PC, Mulrow CD, Pocock SJ, Poole C, Schlesselman JJ, Egger M; STROBE Initiative. Strengthening the reporting of observational Studies in epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *PLoS Med* 2007;16;4:e297.