



## Trabajo Original

Obesidad y síndrome metabólico

### Efecto del manejo de la obesidad clase I con metformina sobre actividad de metaloproteinasas en pacientes con periodontitis crónica

*Effect of the management of class I obesity with metformin on metalloproteinase activity in patients with chronic periodontitis*

Carlos Alberto Zúñiga Cruz<sup>1</sup>, Claudia C. Calzada Mendoza<sup>1</sup>, Iris Danae Miranda Mondragón<sup>1</sup>, Alfonso Bustamante Bacame<sup>2</sup>, Javier Portilla Robertson<sup>3</sup>, Esther Ocharán Hernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Señalización Intracelular. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, México. <sup>2</sup>Clinica Periférica Dr. Salomón Evelson Guterman. Facultad de Odontología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. <sup>3</sup>Laboratorio de Patología Bucal. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Odontología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México

### Resumen

**Introducción:** el principal problema de salud pública en México es la obesidad y sus enfermedades asociadas, incluyendo las bucales.

**Objetivo:** evaluar el efecto del tratamiento con metformina en pacientes obesos de clase I sobre la actividad de las metaloproteinasas presentes en el periodonto con periodontitis crónica.

**Métodos:** se realizó un estudio clínico con 68 pacientes mujeres con obesidad de clase I y enfermedad periodontal. Se dividieron en 4 grupos; a 2 de ellos, además del tratamiento periodontal, se les administro metformina de 850 mg al día durante seis semanas. Se tomaron 2 muestras por paciente de tejido periodontal antes y después de cada tratamiento y se midió el índice de masa corporal (IMC), el índice de placa dentobacteriana y de inflamación. Mediante zimografía en gel de acrilamida se midió la actividad de las metaloproteinasas en la muestra de tejido recolectada. Los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva *t* de *student* para muestras relacionadas y se realizó ANOVA de una vía considerando  $p < 0,01$  como estadísticamente significativa.

**Resultados:** en el grupo de pacientes a las que se les administro metformina al final del tratamiento se observó una disminución del índice de masa corporal, del grado de inflamación y menor actividad de metaloproteinasas respecto al grupo control (65% frente a 25%;  $p < 0,01$ ).

**Conclusiones:** el tratamiento con metformina en pacientes con obesidad de clase I y enfermedad periodontal disminuye el IMC, mejora los síntomas de la periodontitis crónica y disminuye la actividad de las metaloproteinasas 1, 3, 8 y V presentes en el periodonto de estos pacientes.

#### Palabras clave:

Obesidad.  
Metformina.  
Metaloproteinasas.  
Periodontitis crónica.

### Abstract

**Introduction:** in Mexico the main problem in public health is obesity and other diseases that are associated with this condition, including oral health.

**Objective:** to evaluate the effect of metformin treatment in patients with class I obese on the activity of metalloproteinases present in periodontium with chronic periodontitis.

**Methods:** a clinical study was conducted in 68 patients with class I obesity and periodontal disease. They were divided into 4 groups. 2 of them, in addition to the periodontal treatment, were administered metformin 850 mg per day for six weeks; 2 samples were taken per patient of periodontal tissue before and after each treatment, body mass index, plaque index and inflammation were measured. Acrylamide gel zymography was used to measure the activity of metalloproteinases in the sample of tissue collected. The data obtained were analyzed by descriptive statistics, student *t* for related samples and one-way ANOVA was performed considering  $p < 0.01$  as statistically significant.

**Results:** in the group of patients who were administered metformin at the end of the treatment, there was a decrease in the body mass index, the degree of inflammation and lower metalloproteinase activity, compared with the control group (65% vs 25%;  $< 0.01$ ).

**Conclusions:** treatment with metformin in patients with obesity class I and periodontal disease decreases BMI, improves the symptoms of chronic periodontitis and decreases the activity of metalloproteinases 1, 3, 8, V present in periodontium of these patients.

#### Key words:

Obesity. Metformin.  
Metalloproteinases.  
Chronic periodontitis.

Recibido: 29/03/2019 • Aceptado: 24/06/2019

Zúñiga Cruz CA, Calzada Mendoza CC, Miranda Mondragón ID, Bustamante Bacame A, Portilla Robertson J, Ocharán Hernández E. Efecto del manejo de la obesidad clase I con metformina sobre actividad de metaloproteinasas en pacientes con periodontitis crónica. *Nutr Hosp* 2019;36(5):1095-1100

DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.02602>

#### Correspondencia:

Esther Ocharán Hernández. Laboratorio de Señalización Intracelular. Departamento de Estudios de Posgrado e Investigación. Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional. Plan de San Luis y Díaz Mirón, s/n. Colonia Casco de Santo Tomás. 11340 Hidalgo. Ciudad de México, México  
e-mail: [estherocharan@hotmail.com](mailto:estherocharan@hotmail.com)

## INTRODUCCIÓN

La obesidad es una pandemia que afecta a más de 300 millones de personas en todo el mundo. Según datos de UNICEF, México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en obesidad en adultos y el primer lugar en niños (1,2). Este padecimiento se ha asociado a múltiples enfermedades metabólicas, como diabetes *mellitus* (DM), hipertensión arterial (HTA), dislipidemias (3,4) y, recientemente, a la enfermedad periodontal (EP) (5-11), que en México se considera también un problema de salud pública, ya que se estima que el 90% de la población mayor de 45 años presenta algún grado de EP (12); a nivel mundial, la OMS la coloca como la segunda enfermedad bucal más prevalente (12,13).

La EP se describe de forma general como gingivitis y periodontitis. Es producida principalmente por agentes infecciosos de la placa dentobacteriana (PDB) (14,15). En ambos casos se inicia un proceso de inflamación y producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), pero en la segunda existe pérdida de tejido de soporte dental ocasionada por la activación de enzimas proteolíticas llamadas metaloproteinasas (MMP), capaces de contribuir a la destrucción del periodonto (14,16-18). Se ha reportado la activación de estas moléculas en enfermedades sistémicas crónicas como DM, HTA y dislipidemias (3,4). Estas proteínas forman parte de una superfamilia de enzimas con actividad proteolítica que rompen las cadenas de colágeno intersticial tipos I, II y III. Normalmente intervienen en el remodelado de tejidos; sin embargo, en procesos patológicos, como en la periodontitis crónica (PC), afectan a las fibras periodontales y al tejido adyacente responsable de mantener al órgano dental en el alveolo (19). Algunas de las más estudiadas en esta enfermedad son las colagenasas (MMP - 1, MMP-3, MMP-8 y MMP-V) (14,19). El tratamiento de la EP consiste en el control de PDB, en la remoción manual del cálculo dental, raspado y alisado radicular, y, en casos avanzados, en el injerto de hueso o encía, esto acompañado en algunas ocasiones de antibióticos locales y antioxidantes (20). Sin embargo, a pesar de la terapia, algunos pacientes no responden adecuadamente, lo que lleva a pensar que existen factores intrínsecos del huésped que contribuyen a la mala respuesta al tratamiento.

Las enfermedades crónico-degenerativas y la enfermedad periodontal en la mayoría de los casos tienen como factor común la obesidad (5,21,22). Está demostrado que la acumulación de grasa produce un estado proinflamatorio crónico sistémico mediado por adipocinas e interleucinas capaces de activar MMP (23-25), lo que podría estar propiciando la mala respuesta al tratamiento periodontal. Dentro de las guías de tratamiento para estos padecimientos, se indica la disminución del índice de masa corporal (IMC) mediante dieta y ejercicio, con lo que se obtiene mejoría en las patologías asociadas a la obesidad (26), pero no existe farmacoterapia bien establecida en los casos en que esta intervención no funcione adecuadamente. La OMS sugiere como terapia adyuvante el manejo con metformina (26). Este fármaco mejora la sensibilidad a la insulina mediante la optimización del uso de glucosa en tejidos como el hígado o el músculo, lo que evita la generación de productos finales de la glicación, que están

implicados en la degeneración y el daño de tejido periodontal (27,28). También aumenta la lipólisis y la beta-oxidación en el tejido adiposo blanco, lo que reduce la acumulación de triglicéridos, con lo que se disminuye la producción de citocinas y el estado proinflamatorio (29,30). También se ha demostrado que tiene un efecto antioxidante sistémico (29,31,32), con lo que disminuye la adhesión de neutrófilos y la quimiotaxis, evitando así el daño oxidativo local y el general (27).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del control de la obesidad de clase I con metformina sobre la actividad de las MMP en el periodonto de pacientes con periodontitis crónica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se realizó un estudio clínico controlado en 68 mujeres entre 40 y 45 años que asistieron a la clínica Dr. Salomón Evelson Guterman de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, que fueron diagnosticadas con PC en al menos un cuadrante bucal y que, además, tuvieran diagnóstico de obesidad de clase I, sin tratamiento médico previo, sin otras alteraciones metabólicas o médicas y que hubieran firmado el consentimiento informado. Se excluyeron del estudio pacientes que no cumplían con dichos criterios. Este estudio cumplió con los lineamientos del Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT). El protocolo fue controlado y autorizado por el comité de ética e investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### DIAGNÓSTICO DE OBESIDAD DE CLASE I

El diagnóstico de obesidad de clase I se realizó mediante la medición de peso, talla y el cálculo del IMC, tomando como referencia el parámetro de 30 a 34,9 kg/m<sup>2</sup> como obesidad de clase I, según criterios de la OMS. Todos los datos se tomaron por triplicado y fueron verificados por un médico especialista. Todas las pacientes incluidas en el estudio se remitieron al departamento de nutrición para iniciar un programa adecuado a sus necesidades de alimentación y ejercicio.

### EXAMEN BUCAL

El diagnóstico de enfermedad periodontal fue realizado por un cirujano dentista y un especialista en periodoncia que tomó como parámetros el índice de placa dentobacteriana (IPDB) y la profundidad de sondeo (PS), considerando el índice de inflamación gingival (IIG) de Löe y Silness (33). El criterio utilizado para el diagnóstico de periodontitis generalizada y localizada está basado en los criterios de la Academia Americana de Periodontología (AAP) en su International Workshop for Classification of Periodontal Diseases and Conditions de 1999. En base a su extensión se divide en:

periodontitis localizada a la presencia de la enfermedad en  $\leq 30\%$  de los dientes presentes y periodontitis generalizada en  $\geq 30,1\%$  de los dientes presentes.

## DESARROLLO DEL ESTUDIO

Todas las pacientes recibieron tratamiento periodontal, que consistió en el registro de periodontograma y medición del índice de inflamación gingival (IIG), control de placa dentobacteriana (PDB) y toma de muestra inicial de tejido periodontal de 2 mm de diámetro. Posteriormente, se dividieron en 4 grupos: 2 grupos control, 1 con periodontitis crónica localizada (PCL) y otro con periodontitis crónica generalizada (PCG); 2 grupos con tratamiento de 850 mg de metformina cada 24 horas (29) durante seis semanas, 1 grupo con PCL y otro con PCG (ambos grupos fueron aleatorizados con su grupo control). Una vez que se logró disminuir el índice de placa dentobacteriana al 10% de la inicial, se realizó raspado y alisado radicular y se recolectó la segunda muestra de tejido durante el procedimiento. Las muestras fueron procesadas mediante zimografía en gel de acrilamida y los resultados fueron escaneados y analizados mediante densitometría (34). En todos los grupos se midió el índice de placa dentobacteriana (IPDB), IIG y IMC cada semana durante las 6 sesiones que duró el estudio.

## TOMA DE MUESTRAS

Después de realizar asepsia del área en la que se tomó la muestra, se anestesió de forma regional para evitar que el anestésico tuviera contacto directo con el tejido a recolectar (la toma de muestra de la encía se hizo mediante la presión de una cuchilla cilíndrica). Posteriormente, se retrajo el tejido con pinzas de disección y se cortó con hoja de bisturí (35). Las muestras fueron almacenadas en RNeasy<sup>®</sup>, que mantiene la estructura de las proteínas. No se utilizó inhibidor de proteasas para evitar que interfiriera con la actividad de MMP. La muestra fue congelada y almacenada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (35,36). El procedimiento se realizó por segunda vez durante el raspado y el alisado radicular.

## TÉCNICA DE ZIMOGRFÍA

Para la realización de la técnica de zimografía se prepararon geles de acrilamida, que consistían en dos fases:

1. Gel de separación (*resolving*). Para su preparación se utilizó *buffer* Tris 0,36 M a pH 8,8, SDS al 0,01% (dodecilsulfato sódico), acrilamida-bis acrilamida (25%), grenetina 0,1%, APS al 0,06% (persulfato de amonio) y TEMED al 0,13% (tetrametilendiamina).

2. Gel de concentración (*stacking*). Se preparó con *buffer* Tris (0,06 M) a pH 6,8, SDS (0,1%), acrilamida-bis acrilamida (12%), APS (0,1%) y TEMED (0,13%). Posteriormente se colocaron 25  $\mu\text{g}$  de proteína en los geles y se corrió una electroforesis vertical durante 120 minutos a 100 mv. A continuación, fueron incubados a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas en *buffer* para MMP (Tris [0,25 M], NaCl [1 M] y  $\text{CaCl}_2$  [0,025 M]), que contiene una mezcla iónica que

favorece la actividad enzimática. Finalmente se tiñeron con azul de metileno para su análisis y lectura mediante densitometría tomando como referencia el peso molecular correspondiente a 54 kd al que corresponden las MMP 1, 3, 8 y V (17,19) con el programa Image Processing and Analysis in Java (ImageJ), diseñado por el National Institutes of Health (Estados Unidos) (37,38).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tamaño de la muestra se calculó mediante la fórmula de comparación para dos proporciones. Se obtuvo una muestra de 17 pacientes por grupo. Se realizó estadística descriptiva y se analizó con *t* de *student* para muestras relacionadas y no relacionadas, dependiendo de los grupos, así como ANOVA de una vía, con una prueba *post hoc* de Tukey. Para el análisis del índice de inflamación gingival se utilizó U de Mann Whitney, considerando una diferencia estadísticamente significativa cuando  $p < 0,01$ . Se realizó una regresión lineal asociando las variables IMC y actividad de MMP.

## RESULTADOS

El promedio de edad de las pacientes fue de 43 años para ambos grupos. El índice de masa corporal fue de  $34,8\text{ kg/m}^2$  para el grupo control, de  $34,6\text{ kg/m}^2$  y de  $34,1\text{ kg/m}^2$  para los grupos tratados con metformina y con periodontitis generalizada y localizada, respectivamente. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre grupos ( $p = 0,079$ , ANOVA, Tukey).

El grupo de pacientes control tuvo de promedio un IMC de  $34,8 \pm 0,2\text{ kg/m}^2$ , que se mantuvo constante durante las seis semanas de tratamiento, mientras que en los grupos con periodontitis generalizada y localizada tratados con metformina 850 mg cada 24 horas (29) el índice de masa corporal disminuyó de promedio  $1,6\text{ kg/m}^2$  respecto a la media inicial, con una diferencia significativa ( $p = 0,0087$  ANOVA de una vía, Tukey) (Fig. 1).

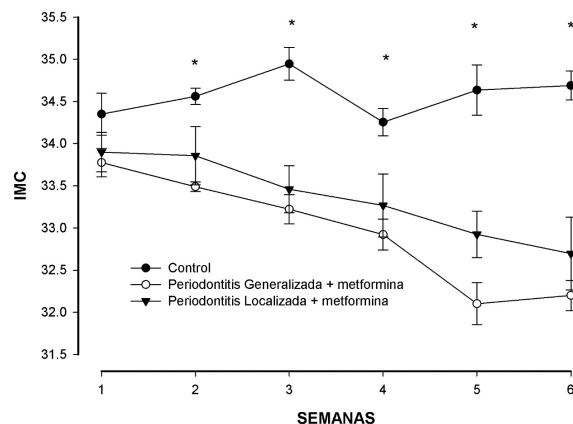


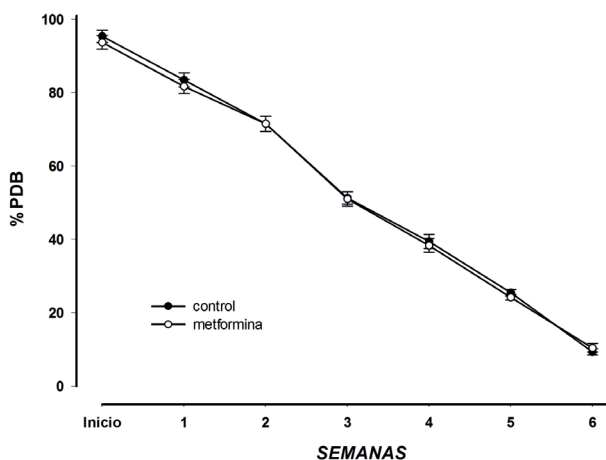
Figura 1.

Índice de masa corporal (IMC) de los pacientes con periodontitis crónica local y generalizada tratados con metformina en comparación con el grupo control (solo tratamiento estándar).

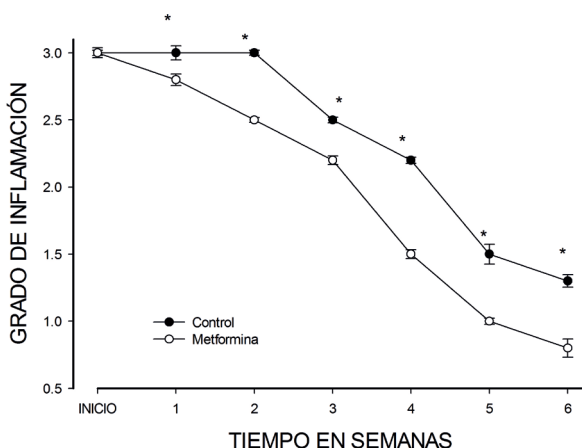
En la figura 2 puede observarse que existe reducción del índice de placa dentobacteriana con diferencia estadística entre el inicio y el final del tratamiento, pero sin diferencia entre el grupo control y los grupos tratados con metformina ( $p = 0,63$  t de Student para muestras no relacionadas) (Fig. 2).

En el grupo de pacientes con tratamiento periodontal coadyuvado con metformina se observó mayor disminución del IIG; esto comparado con el grupo de pacientes con tratamiento periodontal sin la administración del fármaco, con diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,023$ , U de Mann-Whitney) (Fig. 3).

En la figura 4 puede observarse en la primera barra el promedio de la actividad basal de las MMP de los pacientes control, estableciendo este valor como el 100% de la actividad enzimática-



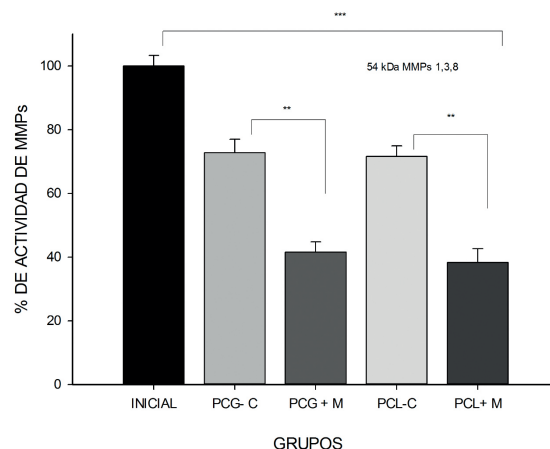
**Figura 2.** Índice de placa bacteriana dental (PDB) en pacientes tratados con metformina en comparación con el grupo control.



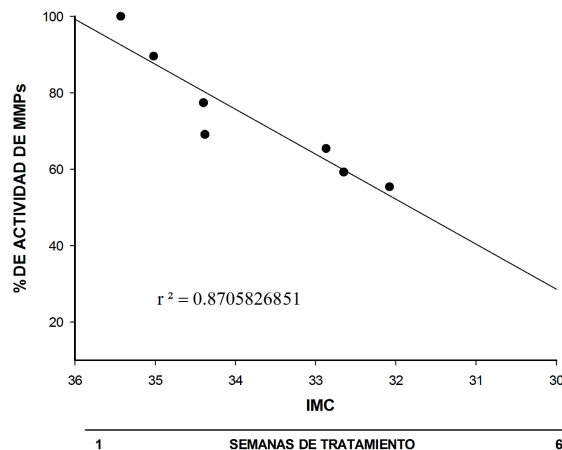
**Figura 3.** Grado de inflamación (medido como el índice de inflamación, de acuerdo con Løe y Silness) en pacientes solo con tratamiento periodontal frente a pacientes con tratamiento periodontal + metformina.

ca en periodonto. En las barras posteriores puede apreciarse en todos los casos la disminución de la actividad enzimática, con diferencia significativa con respecto a la basal. Por otro lado, se observa entre los grupos de PCG y PCL tratados con metformina una disminución del 65% de la actividad con respecto a la basal, mientras que los grupos sin metformina (PCG-C y PCL-C) mostraron una disminución del 25% con este punto de referencia. Esta diferencia fue significativa entre los dos grupos control y los grupos con tratamiento.

Al realizar la correlación lineal entre el IMC y el tanto por ciento de actividad de MMP, se observa que al disminuir el IMC baja también el porcentaje de actividad de MMP, con una  $r^2 = 0,870582$  (esto depende del número de semanas de tratamiento con metformina de las pacientes estudiadas) (Fig. 5).



**Figura 4.** Actividad de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) (1,3,8) por grupo de tratamiento (todos los grupos recibieron tratamiento periodontal estándar): control de periodontitis generalizada (PCG-C), periodontitis generalizada con tratamiento con metformina (PCG+M), (PCL) periodontitis localizada y (PCL+M) con tratamiento con metformina. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el valor inicial y los grupos tratados con metformina ( $p = 0,0067$ , t de student diferencia entre grupo, así como los grupos control ( $p = 0,0089$  ANOVA, Tukey). \*\*Diferencia entre grupo; \*\*\*Valor inicial.



**Figura 5.** Correlación entre la disminución del IMC y la actividad de MMP.

## DISCUSIÓN

En México, la obesidad es uno de los principales problemas de salud pública (1). Su manejo es muy complejo debido a su asociación con enfermedades sistémicas y locales (5,22). El estado proinflamatorio que promueve es el responsable de desencadenar una serie de reacciones bioquímicas, entre ellas la activación de las MMP, capaces de afectar tejidos de soporte como los dientes.

En 1994, Reynolds demostró que estas enzimas se activaban por el proceso inflamatorio provocado por la microbiota local del periodonto (39), lo que lleva a la pérdida de la inserción de los dientes. Pero no fue hasta 2009 cuando Saito y cols. asociaron la PC con enfermedades como DM, HTA y su relación con la obesidad. Sin embargo, hasta el momento el principal tratamiento de la PC se ha encaminado hacia la resolución del proceso infeccioso a través del alisado y del raspado radicular (40,41), y no se ha considerado la posibilidad de un manejo multidisciplinario que controle el entorno proinflamatorio sistémico del paciente con estas patologías. Así, el presente trabajo se planteó la hipótesis de que el tratamiento adecuado de la obesidad como factor común de la mayoría de las enfermedades crónico-degenerativas podría modificar de manera favorable la respuesta al tratamiento de la periodontitis crónica y romper con el ciclo de inflamación, ya que las MMP se activan en ambas patologías y son las responsables de la pérdida dental. Por lo tanto, resulta de gran interés medir cómo los diferentes tratamientos modifican la actividad proteolítica.

De forma similar a lo reportado en la literatura (30), en el presente trabajo se observó que el tratamiento con metformina mejora la respuesta al tratamiento higiénico dietético en pacientes con obesidad de clase I, seguramente por las propiedades descritas con anterioridad, y, como era de prever, el uso de metformina no modificó la cantidad de la placa dentobacteriana, ya que este fármaco no tiene actividad antimicrobiana administrado de forma tópica o sistémica (42).

Un aspecto interesante de este trabajo es que el grupo experimental presenta un grado menor de inflamación en el periodonto que el grupo control después del tratamiento, lo que sustenta la hipótesis de que, aunque la EP se produce principalmente por la microbiota nociva del periodonto, los factores intrínsecos de los pacientes —como el estado proinflamatorio sistémico producido por la obesidad— contribuyen al mantenimiento de la EP y a la mala respuesta al tratamiento. Al vigilar los problemas metabólicos y al colaborar de manera sistémica al control de la inflamación, los signos clínicos de EP disminuyen considerablemente.

Finalmente, como está descrito en la literatura, se observó que los pacientes con obesidad de clase I tenían un aumento local en la actividad de las MMP 1,3,8 y V (43,44); sin embargo, esta actividad disminuyó en ambos grupos después del tratamiento, y fue más significativa en el grupo tratado con metformina, lo que confirma la necesidad de brindar a los pacientes un tratamiento multidisciplinario para el manejo de esta enfermedad. Por el contrario, el tratamiento de EP también es necesario para el control y el manejo del paciente diabético, hipertenso y obeso, ya que el estrés local también podría contribuir al estrés sistémico, lo que complica el manejo de las enfermedades metabólicas.

Sería muy interesante determinar si existe alguna selectividad de la metformina en la inhibición de esta familia de enzimas, ya que en el presente estudio solo fueron identificadas mediante el peso molecular, lo que deja la incertidumbre sobre la participación de otras MMP, y de este modo determinar cómo la inflamación local contribuye al estrés sistémico. Sin embargo, la información proporcionada por este trabajo es útil, ya que demuestra la interrelación entre la obesidad y la EP, la importancia en su tratamiento multidisciplinario y, finalmente, la necesidad de personal altamente cualificado que brinde un tratamiento integral a una comunidad en la que se pronostica un aumento muy significativo de este tipo de enfermedades.

Este estudio apoya con los resultados obtenidos a recientes estudios en los que se ha demostrado la influencia de factores sistémicos para el desarrollo de la enfermedad periodontal y da la pauta para seguir investigando la participación del entorno sistémico en el desarrollo de este padecimiento. Asimismo, resalta la importancia del manejo multidisciplinario del paciente obeso.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a las autoridades de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México por su confianza y apoyo en la realización del presente estudio. Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el apoyo para hacer posible este estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rivas-Gómez B, Almeda-Valdés P, Tussie-Luna MT, et al. Dyslipidemia in Mexico, a Call for Action. *Rev Invest Clin* 2018;70(5):211-6.
2. Rtveldaz K, Marsh T, Barquera S, et al. Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden. *Public Health Nutr* 2014;17(1):233-9.
3. Lamster IB, Pagan M. Periodontal disease and the metabolic syndrome. *Int Dent J* 2017;67(2):67-77.
4. Schallhorn RA, Patel DN, Chandrasekar B, et al. Periodontal disease in association with systemic levels of interleukin-18 and CXCL16 in patients undergoing cardiac catheterization. *J Periodontol* 2010;81(8):1180-6.
5. Saito T, Shimazaki Y, Kiyohara Y, et al. Relationship between obesity, glucose tolerance, and periodontal disease in Japanese women: the Hisayama study. *J Periodontol Res* 2005;40(4):346-53.
6. Page RC, Beck JD. Risk assessment for periodontal diseases. *Int Dent J* 1997;47(2):61-87.
7. Yoo JJ, Kim DW, Kim MY, et al. The effect of diabetes on tooth loss caused by periodontal disease: A nationwide population-based cohort study in South Korea. *J Periodontol* 2019;90(6):576-83.
8. Losche W, Karapetow F, Pohl A, et al. Plasma lipid and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2000;27(8):537-41.
9. Noack B, Jachmann I, Roscher S, et al. Metabolic diseases and their possible link to risk indicators of periodontitis. *J Periodontol* 2000;71(6):898-903.
10. Katz J, Flugelman MY, Goldberg A, et al. Association between periodontal pockets and elevated cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Periodontol* 2002;73(5):494-500.
11. Moeintaghavi A, Haerian-Ardakani A, Talebi-Ardakani M, et al. Hyperlipidemia in patients with periodontitis. *J Contemp Dent Pract* 2005;6(3):78-85.
12. Zermeno-Ibarra JA, Delgado-Pastrana S, Patino-Marín N, et al. Relationship between overweight-obesity and periodontal disease in Mexico. *Acta odontológica latinoamericana: AOL* 2010;23(3):204-9.

13. Juárez-López ML, Munieta-Pruneda JF, Teodosio-Procopio E. Prevalence and risk factors for periodontal disease among preschool children in Mexico City. *Gac Med Mex* 2005;141(3):185-9.
14. Canavaro C, Teles RP, Capelli Junior J. Matrix metalloproteinases -1, -2, -3, -7, -8, -12, and -13 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a longitudinal randomized split-mouth study. *Eur J Orthod* 2013;35(5):652-8.
15. Dietrich T, García RI. Associations between periodontal disease and systemic disease: evaluating the strength of the evidence. *J Periodontol* 2005;76(Suppl.11):2175-84.
16. Miricescu D, Totan A, Calenic B, et al. Salivary biomarkers: relationship between oxidative stress and alveolar bone loss in chronic periodontitis. *Acta Odontol Scand* 2014;72(1):42-7.
17. Xiang J, Li C, Dong W, et al. Expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2 and extracellular metalloproteinase inducer in human periodontal ligament cells stimulated with interleukin-1 beta. *J Periodontol Res* 2009;44(6):784-93.
18. Jacob-Ferreira AL, Schulz R. Activation of intracellular matrix metalloproteinase-2 by reactive oxygen-nitrogen species: Consequences and therapeutic strategies in the heart. *Arch Biochem Biophys* 2013;540(1-2):82-93.
19. Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 2004;10(6):311-8.
20. Chandra RV, Srinivas G, Reddy AA, et al. Locally delivered antioxidant gel as an adjunct to nonsurgical therapy improves measures of oxidative stress and periodontal disease. *J Periodontol Implant Sci* 2013;43(3):121-9.
21. Saito T, Shimazaki Y, Koga T, et al. Relationship between upper body obesity and periodontitis. *J Dent Res* 2001;80(7):1631-6.
22. Tesaro M, Iantorno M, Campia U. Obesity-related metabolic syndrome and vascular complications. *Int J Endocrinol* 2013;2013:534056.
23. Pischon N, Heng N, Bernimoulin JP, et al. Obesity, inflammation, and periodontal disease. *J Dent Res* 2007;86(5):400-9.
24. Chavey C, Mari B, Monthouel MN, et al. Matrix metalloproteinases are differentially expressed in adipose tissue during obesity and modulate adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2003;278(14):11888-96.
25. Maquoi E, Munaut C, Colige A, et al. Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity. *Diabetes* 2002;51(4):1093-101.
26. Ji L, Li H, Guo X, et al. Impact of baseline BMI on glycemic control and weight change with metformin monotherapy in Chinese type 2 diabetes patients: phase IV open-label trial. *PLoS one* 2013;8(2):e57222.
27. Marchetti E, Monaco A, Procaccini L, et al. Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. *Nutr Metab* 2012;9(1):88.
28. Daudt LD, Musskopf ML, Méndez M, et al. Association between metabolic syndrome and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Braz Oral Res* 2018;32:e35.
29. Zadik Z. Obesity and metformin. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2012;25(1-2):1.
30. Piro S, Rabuazzo AM, Renis M, et al. Effects of metformin on oxidative stress, adenine nucleotides balance, and glucose-induced insulin release impaired by chronic free fatty acids exposure in rat pancreatic islets. *J Endocrinol Invest* 2012;35(5):504-10.
31. Retnakaran R, Ye C, Hanley AJ, et al. Discordant effects on central obesity, hepatic insulin resistance, and alanine aminotransferase of low-dose metformin and thiazolidinedione combination therapy in patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes Obes Metab* 2012;14(1):91-3.
32. Esteghamati A, Eskandari D, Mirmiranpour H, et al. Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Clin Nutr* 2013;32(2):179-85.
33. Loe H. Discussion of: methods and criteria in evaluation of gingival and periodontal response. *Int Dent J* 1970;20(3):502-4.
34. Frankowski H, Gu YH, Heo JH, et al. Use of gel zymography to examine matrix metalloproteinase (gelatinase) expression in brain tissue or in primary glial cultures. *Methods Mol Biol* 2012;814:221-33.
35. Seoane J, Varela-Centelles PI, Limeres-Posse J, et al. A punch technique for gingival incisional biopsy. *The Laryngoscope* 2013;123(2):398-400.
36. Sasaki R, Yamato M, Takagi R, et al. Punch and spindle-shaped biopsies for collecting oral mucosal tissue for the fabrication of transplantable autologous epithelial cell sheets. *J Biomed Mater Res A* 2012;100(10):2849-54.
37. Kupai K, Szucs G, Cseh S, et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010;61(2):205-9.
38. Vandooren J, Geurts N, Martens E, et al. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nat Methods* 2013;10(3):211-20.
39. Reynolds JJ, Hembry RM, Meikle MC. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. *Adv Dent Res* 1994;8(2):312-9.
40. Lee CF, Lin CL, Lin MC, et al. Surgical treatment for patients with periodontal disease reduces risk of end-stage renal disease: a nationwide population-based retrospective cohort study. *J Periodontol* 2014;85(1):50-6.
41. Boutin A, Demers S, Roberge S, et al. Treatment of periodontal disease and prevention of preterm birth: systematic review and meta-analysis. *Am J Perinatol* 2013;30(7):537-44.
42. Berstein LM. Metformin in obesity, cancer and aging: addressing controversies. *Aging (Albany, NY)* 2012;4(5):320-9.
43. Grinin VM, Baiar U, Karaoglanova TB. Matrix metalloproteinases in periodontal disease. *Stomatologija (Mosk)* 2011;90(6):80-4.
44. Silva JA, Lorencini M, Peroni LA, et al. The influence of type I diabetes mellitus on the expression and activity of gelatinases (matrix metalloproteinases-2 and -9) in induced periodontal disease. *J Periodontol Res* 2008;43(1):48-54.