

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 014 971**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2015 PCT/FI2015/050121**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2015 WO15128549**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2015 E 15756044 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2025 EP 3110949**

(54) Título: **Producto de activación de MMP-8, su determinación y uso**

(30) Prioridad:

27.02.2014 FI 20145192

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.04.2025

(73) Titular/es:

**OY MEDIX BIOCHEMICA AB (50.00%)
Klovinpellontie 3
02180 Espoo, FI y
DENTOGNOSTICS GMBH (50.00%)**

(72) Inventor/es:

**SORSÄ, TIMO;
GIESELMANN, DIRK-ROLF;
KORVUO, ARMI;
MAIER, KURT;
MÄNTYLÄ, PÄIVI;
RÄMAN, ISMO y
TIISALA, SINIKKA**

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 014 971 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producto de activación de MMP-8, su determinación y uso

Campo de la invención

- La presente invención se refiere en general al campo del diagnóstico. En particular, la presente invención se refiere a la detección de la activación de MMP-8, productos de activación de MMP-8 o fragmentos de MMP-8 activados en una muestra biológica derivada de un sujeto y a la determinación de una predisposición o un riesgo de padecer una enfermedad o de progresión de la misma. La invención también se refiere al uso del producto de activación de MMP-8 para diagnosticar enfermedades relacionadas con niveles anormales o elevados de MMP-8 activado.

Antecedentes

- Las enfermedades periodontales son un problema importante en la dentición humana. De hecho, se pierden más dientes por enfermedad periodontal que por caries dental. Por lo tanto, existe una gran necesidad de pruebas diagnósticas fiables para la enfermedad periodontal; en particular, existe la necesidad de un diagnóstico temprano de la aparición de la enfermedad, incluso en la etapa temprana de la gingivitis, es decir, el diagnóstico de las etapas tempranas del comienzo de la destrucción del tejido antes de que se produzcan signos visibles de la destrucción.
- La enfermedad periodontal comprende un grupo de trastornos inflamatorios que se originan a partir de infecciones que afectan a la encía y a las estructuras óseas alveolares de la mandíbula que sostienen los dientes.
- La causa principal de las enfermedades periodontales es la placa bacteriana y la biopelícula bacteriana adherida a los dientes. Provocan inflamación de la encía, lo que puede provocar la destrucción de las estructuras que soportan los dientes y el hueso en la enfermedad periodontal. Suele haber una gran acumulación de bacterias en la placa y la biopelícula, tanto por encima (supragingival) como por debajo (subgingival) de la línea de las encías.
- La gingivitis (inflamación de las encías) se distingue de la periodontitis en que, en la gingivitis, las encías están inflamadas pero no se detectan bolsas periodontales profundas (>4 mm); por lo tanto, no se asocia con la gingivitis una destrucción irreversible de las estructuras blandas y duras (óseas) de soporte de los dientes. La periodontitis se caracteriza por la inflamación de las encías y la destrucción de las estructuras blandas y duras (óseas) de soporte de los dientes; sin embargo, la periodontitis puede pasar desapercibida en una encía de aspecto clínico sano.
- Aunque en los últimos 20 años se ha llevado a cabo una vasta investigación y desarrollo de sistemas de diagnóstico mejorados, lo que se refleja en un aumento de las publicaciones (p. ej., búsqueda Pubmed Abr 2010/Jul 2013:MMP-8 640/891 Citas, MMP-8 en Periodoncia-/Implantología 95/136 Citas), la enfermedad periodontal y su sucesora en los implantes dentales, la peri-implantitis, todavía causa miles de millones de dólares en costes de tratamiento dental.
- A pesar de una creciente concienciación, de los grandes esfuerzos realizados en el tratamiento y de la disponibilidad de mejores sistemas de pruebas que permiten identificar la enfermedad en la consulta o mediante pruebas de laboratorio, la enfermedad se está extendiendo/creciendo dramáticamente (Deutsche Mund Gesundheits Studie IV, 2006) en países industrializados, por ejemplo Alemania.
- "Según la definición de los CDC considerando las localizaciones mesiobucal y distolingual, la prevalencia de periodontitis era del 70,9% y del 87,4% en ambas cohortes de edad, con una cuarta parte y la mitad presentando formas graves, respectivamente" (B. Holtfreter et al., 2010)
- En los últimos 25 años, se ha logrado un progreso espectacular en las tecnologías restauradoras gracias al desarrollo de implantes dentales que pueden reemplazar dientes que se han perdido por periodontitis y otras causas en los años anteriores.
- Sin embargo, en el caso de los implantes dentales aplica la misma patología o una patología similar a la que aplica en el caso de los dientes naturales en la periodontitis.
- Como se ha descrito anteriormente para los dientes naturales, la periodontitis es causada principalmente por patógenos en la biopelícula que se adhiere a la superficie del implante, a la conexión entre un implante y el pilar y a la construcción supra protésica; se provoca una reacción similar del huésped del tejido que rodea el implante dental: desencadenada por restos bacterianos (LPS), se induce una reacción inflamatoria que puede descontrolarse y en su curso descargarán altas cantidades de proteasas, principalmente MMP-8.
- De manera similar a los dientes naturales, una activación desequilibrada de MMP-8 puede conducir a una hiperactivación y concentraciones extremadamente altas de MMP-8 activa (aMMP-8) en el líquido del surco periimplantario (PISF) (Ma J, et al., 2000, Xu L et al., 2008) y puede, dentro de un tiempo individualmente impredecible, conducir a una pérdida significativa de hueso alveolar (peri-implantitis) y, en consecuencia, a una pérdida del implante.
- Una vez que se llega a una etapa de peri-implantitis, existen pocas opciones para tratar la enfermedad. El diagnóstico clínico de la peri-implantitis, equivalente a la periodontitis (Ma J, et al.: 2000 y Xu L, et al. 2008), consiste en medir el nivel de destrucción que la enfermedad ya ha causado, por ejemplo, mediante el sondeo de la pérdida de inserción o

la inspección de una radiografía. Otros métodos, como el análisis de proteínas, han demostrado no ser lo suficientemente específicos o los parámetros no son accesibles mediante diagnósticos en la consulta o las muestras biológicas relevantes no son estables para ser enviadas a un laboratorio especializado para el diagnóstico de rutina.

5 Por ello, sigue siendo de gran interés para los profesionales dentales, profesionales médicos e incluso para el control del paciente en casa, desarrollar sistemas de prueba, especialmente pruebas rápidas en la consulta, que sean capaces de reconocer no solo las proteasas activas (como la MMP-8), sino también el proceso de activación. Esto puede permitir un mejor juicio predictivo o un análisis pronóstico de la situación periodontal individual, lo que es importante en caso de una enfermedad periodontal futura o existente en la dentición natural y en el caso de implantes para la detección temprana del riesgo de trastornos periimplantarios.

10 Esto permitirá a los médicos derivar a los pacientes de riesgo a un profesional dental lo antes posible, y permitirá a los profesionales dentales aplicar un tratamiento preventivo más temprano y motivará a los pacientes a tener una mejor higiene bucal. La detección temprana y el posterior tratamiento profiláctico de la enfermedad/trastornos periodontales puede, como ya han aprendido los sistemas de atención de la salud en la profilaxis de la caries, ayudar a ahorrar miles de millones de dólares en costes de tratamiento y restauración.

15 Además, hoy en día está bien documentado que la periodontitis (crónica) interactúa con numerosas enfermedades sistémicas y se considera un factor de riesgo significativo en numerosas enfermedades sistémicas como la diabetes, infarto de miocardio (IM), accidente cerebrovascular y otras enfermedades cardiovasculares y neurológicas (ECV), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), artritis reumatoide (AR), enfermedad de Crohn (MC), sepsis, VIH, borreliosis y otras inflamaciones sistémicas de bajo grado, síndrome metabólico, obesidad, nefropatías, trasplante de tejidos, trastornos ortopédicos y para parto prematuro (PTD), bajo peso al nacer y riesgos reproductivos como disfunción eréctil, recuento reducido de espermatozoides y menor movilidad de los espermatozoides.

20 Por ejemplo, la razón de probabilidades aumenta en pacientes con periodontitis frente a pacientes periodontalmente sanos con diabetes (tasa de mortalidad) = 7,7, para PTD 7,5, para accidentes cerebrovasculares: 8,5. La periodontitis es un factor de riesgo bien reconocido para el IM, la diabetes y los accidentes cerebrovasculares. Muchos de estos estudios también han demostrado la relevancia de la MMP-8 como biomarcador sistémico y local (oral) de la enfermedad periodontal.

25 Por ello, la capacidad de diagnosticar la aparición temprana de la enfermedad periodontal e identificar a aquellos pacientes en riesgo de desarrollar o de que progresen trastornos periodontales con sistemas de pruebas de pronóstico es crucial no solo dentro de la industria/campo dental sino de hecho para toda la industria/campo médico y el sistema de atención de la salud. AETNA, una compañía de seguros de salud de EE. UU., ha demostrado que el coste total de la salud de, por ejemplo, los diabéticos que se han sometido a un tratamiento periodontal frente a aquellos que no lo han recibido se redujo en un 16 %, lo que indica la importancia y el impacto de las enfermedades bucales y da motivos para pensar en lo que una mejor detección temprana de los riesgos periodontales en combinación con un tratamiento profiláctico puede significar para los pacientes y el coste total de la atención de la salud en el futuro.

30 35 La MMP-8 sistémica también desempeña un papel en otras enfermedades. El papel predominante de la MMP-8 en el recambio de la matriz extracelular, la modulación de las respuestas inflamatorias y otros procesos fisiológicos, la implicación de la MMP-8 en una amplia gama de patologías y el papel de la MMP-8 como diana farmacológica o marcador de enfermedad en algunos trastornos inflamatorios y en la progresión del cáncer está bien documentado. La MMP-8 se describe como una posible diana farmacológica en una amplia gama de trastornos inflamatorios y, en 40 los pacientes, los niveles elevados de MMP-8 a menudo se asocian con la progresión de la enfermedad inflamatoria (Dejonckheere E. et al., 2011).

45 Se ha descubierto que los niveles séricos elevados de MMP-8 en etapas tempranas predicen un desenlace fatal en infecciones sépticas y enfermedades cardiovasculares. Además, se ha mostrado que los pacientes con meningitis bacteriana (MB) tienen niveles elevados o altos de MMP-8 en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y también que los niveles de MMP-8 en el LCR de los niños con MB son significativamente más altos entre los no supervivientes que entre los supervivientes.

También se sabe que la inflamación y/o infección en el líquido amniótico es un factor de riesgo de parto prematuro y resultados neonatales adversos. La MMP-8 se ha utilizado como marcador para la predicción y el diagnóstico de infección/inflamación y también para el desarrollo de parto prematuro y complicaciones neonatales.

50 55 El documento WO96/07103 A1 divulga el reconocimiento de MMP-8 activo y el diagnóstico de la enfermedad periodontal. Schnierer S et al. ("The Recombinant Catalytic Domain of Human Neutrophil Collagenase Lacks Type I Collagen Substrate Specificity", Biochemical and Biophysical Research Communications, Elsevier, Amsterdam, NL, vol. 191, n.º 2, 15 de marzo de 1993, páginas 319-326) divulga un fragmento de 158 residuos de MMP-8. Romanelli Raquel et al. (Activation of neutrophil collagenase in periodontitis", Infection and Immunity, vol. 67, n.º 5, mayo de 1999, páginas 2319-2326) divulga un dominio catalítico de 163 residuos de MMP-8.

Breve descripción de la invención

Un objeto de la invención era proporcionar un método para determinar una mayor predisposición al riesgo o un proceso

activo que conduce a una enfermedad relacionada con la degradación del tejido periodontal o periimplantario, la inflamación periodontal o peri-implantaria.

Otro objeto de la invención era proporcionar un método para detectar la activación de o procesos de activación de MMP-8 en una muestra biológica derivada de un sujeto.

5 Otro objeto de la invención era proporcionar un método para detectar la presencia de especies de MMP-8 en muestras derivadas de diferentes grupos de pacientes.

Otro objeto de la invención era desarrollar métodos para diagnosticar enfermedades relacionadas con la formación de; la presencia de; el aumento de la concentración de; o la activación de MMP-8, especialmente de un producto de activación de MMP-8 tal como un producto de activación de la parte media de MMP-8.

10 También se puede diseñar un ensayo de combinación en donde el producto de activación de la parte media de MMP-8 se detecta individualmente o en grupos o junto con las especies de MMP-8 activas más grandes. El ensayo de combinación es especialmente útil cuando el epítopo reconocido por un anticuerpo es un epítopo común presente en ambas o varias moléculas, tanto en el producto de activación como en la MMP-8 activa; y/o cuando el epítopo está presente de forma múltiple en el producto de activación de MMP-8 en comparación con la molécula de MMP-8 activa más grande; y/o cuando se crean múltiples productos de activación de MMP-8 a partir de una única molécula de MMP-8 durante el proceso de activación, un fenómeno llamado efecto de multiplicación estérica.

15 Aspectos de la invención se refieren a la detección de la presencia de un producto de activación de MMP-8, tal como un producto de activación de la parte media de MMP-8, que tiene un tamaño de 10-35 kDa, preferiblemente 10-30 kDa, más preferiblemente 20-35 kDa, adecuadamente 10 kDa, 11 kDa, 12 kDa, 13 kDa, 14 kDa, 15 kDa, 16 kDa, 17 kDa, 18 kDa, 19 kDa, 20 kDa, 21 kDa, 22 kDa, 23 kDa, 24 kDa, 25 kDa, 26 kDa, 27 kDa, 29 kDa, 30 kDa, 31 kDa, 32 kDa, 33 kDa, 34 kDa y/o 35 kDa o a la detección de dicho producto de activación de MMP-8 en una muestra.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para determinar la activación de MMP-8 en muestras; que comprende proporcionar una muestra biológica de un sujeto, detectar la presencia de uno o más productos de activación de MMP-8, especialmente productos de activación de la parte media de MMP-8 en una muestra, y opcionalmente correlacionar la presencia del producto de activación de MMP-8 o del(de los) producto(s) de activación de la parte media de MMP-8 en una muestra con la presencia de partes más grandes de MMP-8 activa en la muestra, en donde la presencia del producto de activación de MMP-8 o del producto de activación de la parte media de MMP-8 en la muestra es indicativa, predictiva y/o confirmatoria de la presencia de MMP-8 activa en la muestra, y que por ejemplo mejora la detección analítica de MMP-8 activa y su poder predictivo en un ensayo. Por ejemplo, los productos de activación de MMP-8 en el fluido oral elevados de forma repetida o crónica predicen la respuesta al tratamiento e indican los sitios y/o pacientes en riesgo de progresión de la enfermedad, por ejemplo, pérdida de inserción en periodontitis.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a diagnosticar adicionalmente la presencia o una predisposición a una enfermedad o progresión de una enfermedad que comprende:

30 determinar la presencia de uno o más productos de activación de MMP-8, tales como productos de activación de la parte media de MMP-8 en una muestra biológica obtenida del sujeto;

35 comparar los resultados de la detección con una muestra de referencia mediante la cual se diagnosticará la presencia o predisposición a la enfermedad, en donde

40 a) la muestra de referencia se deriva de un sujeto o un grupo de pacientes que se sabe que tiene un nivel normal de MMP-8, por lo que resultados similares para la muestra biológica y la muestra de referencia son indicativos de que el sujeto actualmente no tiene o no está predisposto a padecer la enfermedad o no tiene o no está predisposto a un riesgo de desarrollar o que progrese la enfermedad, y por lo que un nivel elevado del producto de activación de MMP-8 o del producto de activación de la parte media de MMP-8 en la muestra biológica en comparación con la muestra de referencia es indicativo de que el sujeto actualmente (en el momento de la prueba) tiene la enfermedad o está predisposto a padecer la enfermedad o está predisposto a tener un mayor riesgo de desarrollar o que progrese la enfermedad; o

45 b) la muestra de referencia se deriva de un sujeto o un grupo de pacientes que se sabe que actualmente tiene la enfermedad o está predisposto a padecer la enfermedad, por lo que resultados similares para la muestra biológica y la muestra de referencia son indicativos de que el sujeto tiene o está predisposto a padecer la enfermedad o tiene o está predisposto a un riesgo de desarrollar o que progrese la enfermedad.

50 Las características caracterizadoras de la invención se presentan en las reivindicaciones adjuntas.

Otro objeto de la invención era determinar la asociación de las especies moleculares de MMP-8 que representan fragmentos de activación de MMP-8 con los niveles de inmunorreactividad de MMP-8 analizados mediante ensayo inmunofluorométrico resuelto en el tiempo (IFMA) y el método inmuno-ELISA (IEMA, ELISA) y con diferentes niveles de carga inflamatoria periodontal.

Descripción de los dibujos

Figura 1A muestra IFMA de MMP-8 y **Figura 1B** muestra los niveles de IEEMA de MMP-8 en los Grupos de estudio 1-4 (Ejemplo 1) según el estado de tabaquismo cuando se tomó en consideración el número de dientes. La tendencia para los no fumadores en los Grupos 1-4 es significativa tanto para IFMA ($p = 0,010$) como para IEEMA ($p = 0,028$).

Figura 2A muestra la especie MMP-8 y sus combinaciones. La transferencia de bosque que representa la razón de probabilidades (nivel de confianza del 95 %, cl) de prevalencia de especie MMP-8 kDa. Variable dependiente: nivel de IFMA (ajustado por número de dientes) > nivel medio en el Grupo 4 (fuerte carga inflamatoria periodontal). La asociación es significativa. **Figura 2B** muestra la especie MMP-8 y sus combinaciones. La transferencia de bosque que representa la razón de probabilidades (95 % cl) de prevalencia de especie MMP-8 kDa. Variable dependiente: tabaquismo. La asociación es significativa.

Figura 2C muestra la especie MMP-8 y sus combinaciones. La transferencia de bosque que representa la razón de probabilidades (95 % cl) de prevalencia de especie MMP-8 kDa. Variable dependiente: tabaquismo. La asociación es significativa.

Figura 3 muestra el análisis de la curva característica operativa del receptor (ROC) para la evaluación de la sensibilidad y especificidad diagnósticas de los niveles IFMA e IEEMA de MMP-8 (**Figura 3A**) y prevalencia de especie MMP-8 Grupo 4 de 25+35 kDa con fuerte carga inflamatoria periodontal como variable de estado (**Figura 3B**). Para las áreas bajo la curva ROC, los intervalos de confianza del 95% y los valores p, véase el Ejemplo 1.

Figura 4 muestra un análisis SDS-PAGE (10 %) de los efectos de los activadores de la MMP-8 humana recombinante (Proteaimmun), APMA organomercurial (**Figura 4A**) y NaOCl oxidativo (**Figura 4B**). Se indican las cantidades de rhMMP-8 y los tiempos de incubación. Tanto APMA como NaOCl inducen la generación de especie MMP-8 de menor peso molecular tras la activación. Observe especialmente la formación dependiente del tiempo del fragmento de activación de 20-30 kDa indicada por la flecha. **Figura 4C** muestra un análisis de inmunotransferencia Western utilizando rhMMP-8 activado de tres fuentes diferentes (Proteaimmun, Merck e Invent) mediante APMA y NaOCl, fluidos corporales humanos y suero. **Carril 1:** rMMP-8 Proteaimmun; **carril 2:** como carril 1 más APMA; **carril 3:** como carril 1 más NaOCl; **carril 4:** MMP-8 de Merck; **carril 5:** como carril 4 más APMA; **carril 6:** como carril 4 más NaOCl; **carril 7:** antígeno MMP-8 Invent; **carril 8:** como carril 7 más APMA; **carril 9:** como carril 7 más NaOCl; **carril 10:** fluido crevicular gingival de periodontitis humana (GCF); **carril 11:** fluido sulcular de peri-implantitis humana (PISF); **carril 12:** GCF de diente humano tratado mediante ortodoncia; **carril 13:** saliva de periodontitis humana; **carril 14:** enjuague bucal de periodontitis humana; **carril 15:** fluido amniótico humano infectado; **carril 16:** fluido cefalorraquídeo de meningitis; **carril 17:** suero de sepsis humana. El fragmento predominante de 20-30 kDa formado tras la activación de MMP-8 está indicado por la flecha. Véase el Ejemplo 2.

Figura 5 muestra un análisis de inmunotransferencia Western de muestras de fluido amniótico humano no infectado (#16) e infectado (#12, #13 y #19) con diferentes anticuerpos MMP-8 y diferentes concentraciones de MMP-8.

Figura 6 muestra un análisis SDS-PAGE de MMP-8 humana recombinante (Proteaimmun) activada por APMA con diferentes tiempos de incubación. Las bandas utilizadas para la secuenciación se indican en la figura.

Figura 7 muestra un SDS-PAGE de varias fracciones de MMP-8 activa purificada. Las muestras son de izquierda a derecha; regla PAGE con marcador de peso molecular, 1)-4) diversas fracciones de hMMP-8 purificada, marcador de peso molecular Spectra Multicolor.

Figura 8 muestra un análisis de inmunotransferencia Western de varias alícuotas de aMMP-8 humana purificada teñida con anti-hHMMP-8-MoAb 1491-E6-F7. Las muestras son de izquierda a derecha; marcador de peso molecular Dual Xtra; 1)-4) diversas fracciones de hMMP-8 purificada, 5) extracto de placenta antes de la purificación.

45 Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 secuencia de la parte media de MMP-8 que se encuentra en el producto de activación de MMP-8 de las bandas 3, 4, 5 y 6 de la Fig. 6, por ejemplo en la banda 3 que tiene el tamaño de 25 kDa.

SEQ ID NO: 2 Secuencia de la parte media de MMP-8 que se encuentra en el producto de activación de MMP-8 de las bandas 2, 3, 4, 5 y 8 de la Fig. 6, por ejemplo en la banda 4 que tiene un tamaño de 21 kDa.

50 Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la presencia de MMP-8 activada se puede detectar en varias muestras biológicas detectando su producto de activación de MMP-8 recientemente descubierto, tal como un producto de activación de la parte media de MMP-8 que tiene un tamaño de 10-35 kDa, preferiblemente aproximadamente 10-30 kDa, más preferiblemente aproximadamente 20-35 kDa. La MMP-8 fragmentada está

presente en varias formas moleculares definidas que tienen un tamaño de 10 kDa, 11 kDa, 12 kDa, 13 kDa, 14 kDa, 15 kDa, 16 kDa, 17 kDa, 18 kDa, 19 kDa, 20 kDa, 21 kDa, 22 kDa, 23 kDa, 24 kDa, 25 kDa, 26 kDa, 27 kDa, 29 kDa, 30 kDa, 31 kDa, 32 kDa, 33 kDa, 34 kDa y 35 kDa y que comprenden una secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

5 En un aspecto, las diferentes especies moleculares de los fragmentos se pueden correlacionar con el tipo de muestra y se puede utilizar una combinación específica de fragmentos para indicar un determinado estado o enfermedad presente o riesgo de desarrollar una enfermedad en el sujeto del que se deriva la muestra.

10 El producto de activación de MMP-8 o el producto de activación de la parte media de MMP-8, que comprende al menos un fragmento de MMP-8, se puede detectar en la muestra utilizando cualquier método conocido en la técnica. El ensayo puede ser un inmunoensayo cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo. Ejemplos no limitantes de métodos de detección adecuados según la invención incluyen análisis de inmunotransferencia Western, IFMA, EIA, ELISA, ensayo de flujo lateral, ensayo de tira reactiva, ensayo de resonancia plasmónica de superficie, ensayo electroquímico o cualquier otro sistema conocido de ensayo de unión a ligando o de detección directa. Los sistemas o tecnologías de ensayo de detección directa significan cualquier método que no se base en la unión de ligando para el análisis, es decir, tecnologías como; cromatografía de exclusión por tamaño [SEC], como cromatografía líquida de alta presión [HPLC] o cromatografía de permeación en gel (GPC) como SDS-PAGE; o métodos de espectroscopía molecular, como espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía UV/VIS, ionización por electropulverización (ESI), etc.

15 A menos que se especifique lo contrario, los términos que se utilizan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones tienen los significados que se utilizan habitualmente en el campo del diagnóstico. En concreto, los siguientes términos tienen los significados que se indican a continuación.

20 **Producto de activación de MMP-8** se refiere a un producto que comprende uno o más fragmentos de metaloproteinasa de matriz 8 (MMP-8) formados naturalmente durante la activación de MMP-8 *in vivo* o *in vitro*. El producto de activación de MMP-8 se puede producir de forma endógena (es decir, autoactivación) o mediante el uso de agentes de activación o activadores como, entre otros, APMA, NaOCl, otros agentes oxidativos y/o proteasas derivadas del huésped y de microbios.

25 **Producto de activación de la parte media MMP-8** se refiere a un producto que comprende al menos un fragmento de metaloproteinasa de matriz 8 (MMP-8) que comprende una o más secuencias del dominio de la región media de la secuencia total de MMP-8, una o más secuencias que sustancialmente no forman parte de la parte C-terminal o N-terminal, es decir, no forman parte completamente de la parte C-terminal o N-terminal. Las secuencias pueden extenderse, por ejemplo, desde los aminoácidos Asn¹¹⁹ A través de Ala¹³² o de aminoácidos Ile¹⁵¹ a través de Asp¹⁶⁵ de la proteína de longitud completa.

30 **MMP-8 activa** se refiere a las diferentes formas de la colagenasa activada en contraposición a sus formas pro o precursoras.

35 **Activación de MMP-8** se refiere a procesos biológicos o bioquímicos de transformación de preformas de MMP-8 en MMP-8 activa/activada.

40 Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que al detectar un producto de activación de MMP-8, como un producto de activación de la parte media de MMP-8, en lugar de las especies de alto peso molecular de MMP-8 activa, se puede mejorar la detección de MMP-8 activa. Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que el producto de activación de MMP-8 o el producto de activación de la parte media de MMP-8 se encuentra en una concentración absoluta más alta o el número de epítopos es mayor en una muestra biológica que el número de moléculas de MMP-8 activas más grandes que tienen un tamaño típico de 55-95 kDa. Por lo tanto, al utilizar el producto de activación de la parte media de MMP-8 de menor peso molecular como biomarcador, es más fácil lograr un valor de pronóstico o diagnóstico, por ejemplo, mediante un anticuerpo de captura en un inmunoensayo.

45 No está completamente claro por qué la detección de fragmentos más pequeños de MMP-8 es más eficaz para fines de diagnóstico y predicción que la detección de especies de MMP-8 activadas de alto peso molecular. Sin comprometeros con ningún modelo explicativo, una observación preliminar sugiere que, desencadenada por bacterias y respaldada por factores ambientales, adquiridos y genéticos, una respuesta inmunológica del huésped a los patógenos en los PMN de la biopelícula llevará la proenzima de 85 kDa de MMP-8 a la sección de ataque bacteriano y activará la proenzima de 85 kDa. La proenzima de 85 kDa se convierte así en un fragmento de 64 kDa y el 64 kDa se une al colágeno y a las bacterias/biopelícula y causa colagenólisis en el tejido gingival y el hueso alveolar. Si se genera más 64 kDa de los que pueden unirse al colágeno, la cantidad excedente de 64 kDa se unirá al TIMP, que es el regulador natural del sistema MMP.

50 Si aún se forman cantidades excesivas de 64 kDa, estas de forma endógena y/o por acción de oxidantes y proteasas derivadas del huésped y/o microbianas, se fragmentan en fragmentos de 40 kDa y fragmentos de 24 kDa por autólisis y probablemente también en una cantidad de fragmentos pequeños de MMP-8, por ejemplo, 5 kDa, 9 kDa, 14 kDa, etc.

55 Se sabe que el fragmento de 40 kDa desencadena y soporta una mayor activación de la proenzima de 85 kDa, aunque con una actividad reducida.

La situación fisiológica parece ser que primero, en la Fase I, la mayor parte de los 64 kDa inicialmente activados se unen al colágeno tipo 1 en la lesión periodontal y a las bacterias en la biopelícula para la colagenólisis.

Más tarde, en la Fase II; si hay cantidades por encima de 64 kDa disponibles, pueden unirse a los TIMP (TIMP1 y TIMP2) y comenzar a fragmentarse a 40 kDa, que también se unirán a los TIMP.

5 Tanto los 64kDa como los 40kDa forman complejos con una relación molar de aproximadamente 1:1 para la inhibición con TIMP1/TIMP2. Debido a que están unidos a la matriz gingival y la biopelícula, es probable que los 64kDa y los 40kDa estén menos disponibles en la muestra como fluido crevicular gingival (GCF) y el fluido del surco periimplantario (PISF) o el GCF disuelto en saliva o enjuague bucal. Sin embargo, los fragmentos "libres" no unidos, como los 24kDa y otros fragmentos pequeños de MMP-8, se vuelven disponibles a concentraciones elevadas o altas, lo que indica y refleja la fase del proceso de activación temprana de la MMP-8.

10 En la Fase III, si la activación en curso de 85 kDa a 64 kDa produce cantidades excesivas de 64 kDa, estas se autolisarán en fragmentos de 40 kDa (que apoyarán la activación y empeorarán la situación) y en otros fragmentos, incluido el producto de activación de MMP-8 pequeño o el producto de activación de la parte media de MMP-8. Los fragmentos más pequeños, es decir, probablemente todos los demás fragmentos de 5 kDa a 35 kDa, estarán disponibles en la muestra, lo que indica, refleja o representa una fase de riesgo elevado de degradación rápida de los tejidos blandos y duros.

15 Para información de diagnóstico/biomarcador, esto a su vez significa que estos fragmentos más pequeños formados por autólisis in vivo aparecen en altas concentraciones solo en situaciones clínicas cuando el equilibrio natural de 64 kDa "unido" o "inhibido" está o se ha desequilibrado y hay cantidades excesivas de 64 kDa disponibles para autólisis o fragmentación adicional, lo que indica un riesgo elevado de formación o progresión de la enfermedad.

20 20 El producto de activación de MMP-8 detectado o el producto de activación de la parte media de MMP-8 comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 que es un dominio de la parte media (no C-terminal o N-terminal) de MMP-8 y/o la secuencia SEQ ID NO: 2 que es un dominio de la parte media (no C-terminal o N-terminal) de MMP-8.

25 Una realización adicional de la invención proporciona un método para determinar la activación de MMP-8 en una muestra que comprende

- A. proporcionar una muestra biológica de un sujeto;
- B. detectar la presencia de uno o más productos de activación de MMP-8 o productos de activación de la parte media de MMP-8 que comprenden uno o más fragmentos de activación de MMP-8 y que tienen un tamaño entre 10-35 kDa, preferiblemente 10-30 kDa, más preferiblemente aproximadamente 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa o 35 kDa en la muestra biológica; y
- C. correlacionar opcionalmente la presencia del producto de activación de MMP-8 o del producto de activación de la parte media de MMP-8 con la presencia de MMP-8 activa en la muestra; y/o
- D. correlacionar opcionalmente la presencia del producto de activación de MMP-8 o del producto de activación de la parte media de MMP-8 con la presencia de otras partes más grandes de MMP-8 activa en la muestra;

30 35 en donde la presencia de uno o más productos de activación de MMP-8 o productos de activación de la parte media de MMP-8 en la muestra biológica es indicativa y/o confirmatoria y/o predictiva de la presencia de MMP-8 activa en la muestra, y mejora la detección analítica de MMP-8 activa en un ensayo y/o su poder predictivo.

40 45 La presencia de uno o más productos de activación de MMP-8 o de productos de activación de la parte media de MMP-8 se determina típicamente utilizando un sistema de ligando para la detección de un producto de activación de MMP-8 en la muestra biológica. Preferiblemente, el sistema de ligando comprende uno o más anticuerpos, un par de anticuerpos y/o un fragmento de anticuerpo y en donde el ensayo es un inmunoensayo cuantitativo, semicuantitativo o cualitativo, tal como inmunotransferencia Western, IFMA, EIA, ELISA, ensayo de flujo lateral, ensayo de tira reactiva, ensayo de resonancia plasmónica de superficie, ensayo electroquímico o cualquier otro sistema de ensayo de unión a ligando conocido. Los anticuerpos utilizados según diferentes aspectos de la invención pueden ser monoclonales y/o policlonales, opcionalmente recombinantes.

50 55 Según otro aspecto de la invención, la presencia de uno o más productos de activación de MMP-8 o productos de activación de la parte media de MMP-8 se determina utilizando una tecnología de detección directa de proteínas de un producto de activación de MMP-8 en la muestra biológica.

Según una realización de la invención, el método se utiliza para diagnosticar una predisposición o un riesgo de una enfermedad o progresión de una enfermedad que comprende:

- I. determinar la presencia del producto de activación de MMP-8 o del producto de activación de la parte media de MMP-8 en una muestra biológica obtenida del sujeto;
- II. comparar los resultados obtenidos en la etapa I. con una muestra de referencia de la que se desea diagnosticar

una predisposición o un riesgo para la enfermedad o la progresión de la enfermedad, en donde

- 5 a) la muestra de referencia se deriva de un sujeto o un grupo de pacientes que se sabe que actualmente tiene un nivel normal de MMP-8, por lo que resultados similares para la muestra biológica y la muestra de referencia son indicativos de que el sujeto actualmente no tiene o no está predispuesto a padecer la enfermedad o no tiene o no está predispuesto a un riesgo de desarrollar o que progrese la enfermedad, y por lo que un nivel elevado del producto de activación de MMP-8 o del producto de activación de la parte media de MMP-8 en la muestra biológica en comparación con la muestra de referencia es indicativo de que el sujeto actualmente tiene la enfermedad o está predispuesto a padecer la enfermedad o está predispuesto a tener un mayor riesgo de desarrollar o que progrese la enfermedad; o
- 10 b) la muestra de referencia se deriva de un sujeto o un grupo de pacientes que se sabe que actualmente tiene la enfermedad o está predispuesto a padecer la enfermedad, por lo que resultados similares para la muestra biológica y la muestra de referencia son indicativos de que el sujeto tiene o está predispuesto a padecer la enfermedad o tiene o está predispuesto a un riesgo de desarrollar o que progrese la enfermedad.
- 15 Según diferentes realizaciones de la invención, la muestra se obtiene típicamente de fluido crevicular gingival, fluido sulcular periimplantario, placa oral, placa dental, enjuague bucal, colutorio, saliva, fluido del conducto radicular, exudado de herida, pus, biopelícula oral, biopsias de tejido, exudados orales, sangre de lesiones orales o, alternativamente, la muestra no es de la cavidad oral sino de líquido amniótico, suero, plasma, lavado vaginal, lavado nasal, seno nasal, oído, seno, orina, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, heces, exudados, lágrimas, lavado (pulmón), espuma, biopsias de tejido, exudado de heridas y/o sudor.
- 20 En realizaciones preferidas de la invención, la enfermedad es una o más de las siguientes: inflamación periodontal, pérdida (degradación) de tejido periodontal, gingivitis, periodontitis, peri-implantitis, pérdida de dientes, remisión de implantes dentales, pérdida de hueso alveolar, mucositis, alteraciones de la membrana mucosa, inflamaciones periodontales apicales, inflamación del conducto radicular, caries, roturas verticales del hueso maxilar, movimiento dental de ortodoncia, reacciones inflamatorias alérgicas y/o bacteriemia causada por bacterias orales.
- 25 Según otras realizaciones de la invención, la presencia de uno o más productos de activación de MMP-8 o productos de activación de la parte media de MMP-8 es indicativa o predictiva de enfermedades periodontales tales como periodontitis crónica o aguda o peri-implantitis, donde estas enfermedades orales son además indicativas o potenciadoras o un factor de riesgo conocido de enfermedades o trastornos sistémicos como Diabetes I, Diabetes II, EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), síndrome metabólico, obesidad, enfermedad reumática,
- 30 artritis/enfermedades artísticas, osteoporosis, enfermedades ortopédicas, enfermedades autoinmunes, enfermedades de trasplante de tejidos, artritis, infección o remisión de prótesis terminales, enfermedades cardiovasculares tales como accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, arteriosclerosis, riesgos relacionados con el embarazo tales como, pero no limitados a, parto prematuro, bajo peso al nacer, riesgos reproductivos tales como disfunción eréctil, recuento reducido de espermatozoides y menor movilidad de los espermatozoides.
- 35 Según una realización adicional de la invención, la enfermedad es
 - a) enfermedades ginecológicas como inflamación intraamniótica, inflamación materna, enfermedades neonatales, parto prematuro, bajo peso al nacer y patologías amnióticas;
 - b) enfermedades cancerosas, como neoplasias malignas, por ejemplo, cáncer de mama y leucemias;
 - c) enfermedades artísticas/reumáticas como la artritis reumatoide y la artrosis;
- 40 d) enfermedades diabéticas, incluidas todas las formas de diabetes mellitus, enfermedades nefrológicas, enfermedades renales y heridas diabéticas que no cicatrizan;
- 45 e) enfermedades oculares (por ejemplo, provocadas por el líquido lagrimal), como el queratocono y la degeneración marginal pelúcida de la córnea;
- 50 f) enfermedades otorrinolaringológicas (por ejemplo del oído, de los senos nasales);
- g) infecciones e inflamaciones como borreliosis, sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), VIH, infección por H. Pylori, inflamación sistémica, inflamación sistémica de bajo grado, infecciones e inflamaciones pulmonares como bronquitis, bronquiectasias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), infecciones/inflamaciones pediátricas, infecciones neurológicas, inflamaciones y enfermedades como meningitis (por ejemplo, del líquido cefalorraquídeo) y enfermedad de Crohn;
- h) enfermedades cardiovasculares, tales como enfermedades vasculares, aterosclerosis como inflamación de la placa intra-arterial, embolias y accidentes cerebrovasculares;
- i) heridas (por ejemplo, provocadas por exudado de heridas), tales como heridas críticas, heridas crónicas, heridas que no cicatrizan y piel quemada;

- j) enfermedades intestinales (a partir de pruebas fecales)
- k) enfermedades posteriores a traumas o accidentes, y/o
- l) síndrome metabólico y obesidad.

5 Las realizaciones de la invención también proporcionan sistemas y medios legibles por ordenador para hacer que los sistemas informáticos realicen un método para determinar si un individuo tiene una enfermedad o trastorno específico o una predisposición para una enfermedad o trastorno específico (definido anteriormente), basándose en la determinación de un producto de activación de MMP-8 o un producto de activación de la parte media de MMP-8 o información de secuencia.

En particular, la invención se refiere además a un sistema para analizar una muestra biológica que comprende:

- 10 a) un *módulo de determinación* configurado para recibir una muestra biológica y determinar un producto de activación de MMP-8 o un producto de activación de la parte media de MMP-8 en donde el producto de activación de MMP-8 o el producto de activación de la parte media de MMP-8 comprende un fragmento de activación de MMP-8 y tiene un tamaño entre 5-35 kD; y/o
- b) una *información de secuencia*, en donde la información de secuencia comprende SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2
- 15 c) un *dispositivo de almacenamiento* configurado para almacenar información de secuencia del módulo de determinación;
- d) un *módulo de comparación* adaptado para comparar la información de secuencia almacenada en el dispositivo de almacenamiento con datos de referencia, y para proporcionar un resultado de comparación, en donde el resultado de la comparación se deriva de una muestra de referencia que se deriva de;
- 20 un sujeto o un grupo de pacientes que se sabe que actualmente tiene un nivel normal de MMP-8, por lo que resultados similares para la muestra biológica y la muestra de referencia son indicativos de que el sujeto actualmente no tiene o no está predispuesto a padecer la enfermedad o no tiene o no está predispuesto a un riesgo de desarrollar o que progrese la enfermedad; y/o
- 25 un sujeto o un grupo de pacientes que se sabe que tiene la enfermedad o que está predispuesto a padecer la enfermedad, por lo que resultados similares para la muestra biológica y la muestra de referencia son indicativos de que el sujeto tiene o está predispuesto a padecer la enfermedad o tiene o está predispuesto a un riesgo de desarrollar o que progrese la enfermedad, y
- e) un *módulo de visualización* para mostrar un contenido basado en parte en el resultado de la comparación para el usuario, en donde el contenido es una señal indicativa de la presencia o nivel elevado del producto de activación de MMP-8 o del producto de activación de la parte media de MMP-8 en la muestra biológica en comparación con la muestra de referencia que es indicativa de que el sujeto tiene actualmente una enfermedad o está predispuesto a una enfermedad o está predispuesto a tener un mayor riesgo de desarrollar o que progrese una enfermedad.

30 Según otra realización de la invención, la invención puede ser utilizada además por un medio legible por ordenador que tenga instrucciones legibles por ordenador grabadas en el mismo para definir módulos de software que incluyen un módulo de comparación y un módulo de visualización para implementar un método en un ordenador, comprendiendo dicho método:

- 40 a) comparar con el *módulo de comparación* los datos almacenados en un dispositivo de almacenamiento con datos de referencia para proporcionar *un resultado de comparación*, en donde el resultado de la comparación, es decir, la presencia o el nivel elevado del producto de activación de MMP-8 o del producto de activación de la parte media de MMP-8 en la muestra biológica en comparación con la muestra de referencia, es indicativo de que el sujeto padece actualmente una enfermedad o está predispuesto a padecer una enfermedad o está predispuesto a tener un mayor riesgo de desarrollar o que progrese una enfermedad; y
- 45 b) *mostrar* un contenido basado en parte en el resultado de la comparación para el usuario, en donde el contenido es una señal indicativa de tener una enfermedad o de estar predispuesto a tener una enfermedad o de estar predispuesto a tener un mayor riesgo de desarrollar o que progrese una enfermedad.

Ejemplos

50 Los ejemplos siguientes se ofrecen únicamente con el fin de ilustrar diversas realizaciones de la invención y no pretenden limitar la presente invención de ningún modo. Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención, que se define en las reivindicaciones adjuntas, está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados anteriormente.

Ensayo inmunofluorométrico de MMP-8

Las concentraciones de MMP-8 se determinaron mediante un ensayo inmunofluorométrico de resolución temporal (IFMA). Los anticuerpos monoclonales específicos para el fragmento de MMP-8, 1491-E6-F7 y 1492-B3-C11 (Medix Biochemica, Kauniainen, Finlandia) se utilizaron como anticuerpo de captura y anticuerpo trazador, respectivamente.

- 5 El anticuerpo trazador se marcó utilizando quelato de europio (Hemmilä et al., 1984). El tampón de ensayo contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,5 M, CaCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 50 µM, BSA al 0,5 %, azida sódica al 0,05 % y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) a 20 mg/l. Las muestras se diluyeron en tampón de ensayo y se incubaron durante una hora, seguida de una incubación durante una hora con anticuerpo trazador. Se añadió la solución potenciadora y después de 5 minutos se midió la fluorescencia utilizando un Fluorómetro Delfia Research 1234 (Wallac, Turku, Finlandia). La especificidad de los anticuerpos monoclonales frente a MMP-8 correspondió a la de la MMP-8 polyclonal.

Inmunotransferencia Western

Las formas moleculares de MMP-8 se detectaron mediante un kit de inmunotransferencia Western ECL modificado según el protocolo recomendado por el fabricante (GE Healthcare, Amersham, Reino Unido). La MMP-8 humana recombinante indicada y las muestras de fluido/secreción corporal y suero indicadas se mezclaron con tampón de Laemmli sin ningún reactivo reductor y se calentaron durante 5 minutos, seguido de la separación de proteínas con geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS) al 11 %. Después de la electroforesis, las proteínas se electrotransfrieron a membranas de nitrocelulosa (Protran, Whatman GmbH, Dassel, Alemania). La unión no específica se bloqueó con leche en polvo al 5 % (Valio Ltd., Helsinki, Finlandia) en tampón TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 22 mM y Triton-X al 0,05 %) durante 1 hora. A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario 1491-E6-F7 (Medix Biochemica, Kauniainen, Finlandia) durante la noche, seguido de un anticuerpo secundario ligado a peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 1 h. Las membranas se lavaron 4 veces durante 15 min en TBST entre cada etapa. Las proteínas se visualizaron utilizando el sistema de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (GE Healthcare).

Análisis con densitómetro

- 25 La intensidad de diferentes formas de peso molecular de MMP-8 se escaneó y analizó utilizando el escáner densitómetro de imágenes GS-700 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) y el programa Bio-Rad Quantity One mediante corrección de los valores de fondo.

Secuenciación

- 30 La identificación de proteínas y el análisis de datos del proteoma se realizó según el método descrito por Turunen et al. (2012).

Las bandas de gel escindidas que coincidían con la inmunotinción de MDmAb se lavaron y deshidrataron con acetonitrilo (ACN). Las proteínas se redujeron con ditioltreitol 20 mM y se incubaron a 56 °C durante 30 minutos antes de la alquilación con yodoacetamida 55 mM – hidrógeno carbonato de amonio 0,1 M (NH₄OHC₃) en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de lavar con NH₄HCO₃ 0,1 M y deshidratación con ACN los trozos de gel se rehidrataron en 10 a 15 µl de tripsina modificada de grado secuencial (Promega, EE. UU.) en NH₄HCO₃ 0,1 M, hasta una concentración final de 0,01 µg/µl de tripsina y se incubaron para la digestión durante la noche a 37 °C. Los péptidos triptícos se eluyeron de los trozos de gel incubándolos sucesivamente en NH₄HCO₃ 25 mM y luego dos veces en ácido fórmico al 5% durante 15 minutos a temperatura ambiente cada vez. Los péptidos de digestión triptícos resultantes se desalinizaron utilizando columnas de fase inversa Zip Tip µC-18 (Millipore, EE. UU.) y se eluyeron directamente con ACN al 50% - ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% sobre una placa diana MALDI. Se añadió una solución de matriz saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) (Sigma, EE. UU.) en ACN al 33% - TFA al 0,1 %. Los análisis MALDI-TOF se llevaron a cabo con Autoflex III (Bruker Daltonics, Bremen Alemania) equipado con un láser SmartBeam™ (355 nm), operado en modos positivo y reflexivo. Normalmente, los espectros de masas se adquirieron acumulando espectros de 2000 disparos láser y hasta 10000 para espectros MS/MS. Se realizó una calibración externa para asignaciones moleculares utilizando un patrón de calibración de péptidos (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Alemania). Se utilizaron masas de péptidos autolíticos de tripsina para verificar o corregir la calibración. Estos péptidos autolíticos y con los derivados de la queratina, cuando estaban presentes, se eliminaron antes del envío de la búsqueda. Las identificaciones de proteínas se realizaron combinando los archivos (PMF y algunos espectros Lift (MSMS) originados en el mismo punto) y buscando frente a la base de datos SwissProt. Se seleccionó 'otras bacterias' en el campo de taxonomía (más de 42100 secuencias) utilizando Mascot de Matrix Science (Matrix Science Ltd, Reino Unido). Se utilizaron los softwares FlexAnalysis™ v3.0 y Biotools™ v3.1 (Bruker Daltonics) para asignar masas isotópicas moleculares a los picos en los espectros MS y como interfaz del motor de búsqueda entre la transferencia de datos de la lista de masas y las bases de datos en el servidor Mascot, respectivamente. Se establecieron los siguientes parámetros para las búsquedas: tolerancia de precursor de 0,1 Da y tolerancia de fragmento MS/MS de 0,5 o 1 Da para búsquedas combinadas MS y MS/MS, se consideraron modificaciones fijas y variables (cisteína carbamidometilada y metionina oxidada, respectivamente), se permitió una escisión omitida por tripsina. Las identificaciones de proteínas se evaluaron además comparando las masas moleculares calculadas y observadas, así como la calidad de los espectros de masas MS/MS y su coincidencia de secuencia de aminoácidos con los péptidos identificados.

Ejemplo 1**Materiales y métodos**

En este estudio transversal entraron 192 pacientes de una clínica de salud pública dental seleccionados al azar. El protocolo del estudio ha sido presentado en detalle por Leppilahti JM et al. (2011). En resumen, el examen oral comprendió mediciones de la profundidad de sondaje de las bolsas (PPD) con una sonda Florida y del sangrado al sondaje (BOP) realizadas por dos dentistas generalistas cualificados. Las características de antecedentes se registraron mediante cuestionarios y se recogieron muestras de enjuague bucal de todos los pacientes. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado y el protocolo del estudio era aceptado por los comités éticos del Instituto de Odontología de la Universidad de Helsinki y del Hospital Universitario Central de Helsinki.

Los pacientes del estudio se clasificaron en cuatro grupos según su nivel de carga inflamatoria periodontal combinando el Índice de Carga Inflamatoria Periodontal (Lindy O et al. 2008) y % BOP (Leppilahti JM et al. 2011). Los grupos de pacientes formados fueron 1) 31 sujetos periodontalmente sanos sin bolsas periodontales profundizadas (≥ 4 mm) y BOP <10% (Grupo 1), 2) 17 pacientes con BOP $\geq 10\%$ pero sin bolsas periodontales profundizadas consideradas con carga inflamatoria periodontal leve (Grupo 2), 3) 97 pacientes con PIBlxBOP ≤ 100 (nivel moderado de carga inflamatoria periodontal; Grupo 3), y 4) 47 pacientes con PIBlxBOP > 100 (nivel fuerte de inflamación periodontal; Grupo 4).

Muestras de enjuague bucal

Con una pipeta de plástico desechable se colocó 1 ml de agua del grifo en la boca del paciente y, tras un minuto de enjuague, se recogió el líquido en un tubo. La muestra se congeló inmediatamente para realizar más análisis (Leppilahti JM et al. 2011).

Análisis de MMP-8

Después de descongelar, las muestras de enjuague bucal se analizaron para determinar los niveles de MMP-8 mediante un ensayo de inmunofluorescencia de resolución temporal (IFMA), como lo describe Hanemaaijer R. et al. (1997). Brevemente, los anticuerpos monoclonales específicos del fragmento de MMP-8 1491-E6-F7 y 1492-B3-C11 se utilizaron como anticuerpo de captura y anticuerpo trazador, respectivamente. El anticuerpo trazador se marcó utilizando quelato de europio (Hemmilä et al. 1984, Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. Anal Biochem 137: 335-343). El tampón de ensayo contenía Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 0,5 M, M CaCl₂ 5 m, ZnCl₂ 50 μM, albúmina sérica bovina al 0,5 %, azida sódica 0,05 % y DTPA 20 mg/litro. Las muestras se diluyeron en tampón de ensayo y se incubaron durante 1 h, seguida de una incubación durante 1 h con anticuerpo trazador. Se añadió solución potenciadora y, después de 5 min, se midió la fluorescencia utilizando un fluorómetro 1234 Delfia Research (Wallac, Turku, Finlandia).

Los niveles de MMP-8 de las muestras de enjuague bucal también se analizaron mediante el método IEMA descrito anteriormente. Además, las muestras se analizaron mediante inmunotransferencia Western como se describió anteriormente utilizando el anticuerpo trazador (1492-B3-C1 1) del método IFMA para la identificación de diferentes formas moleculares (21, 25, 35, 45, 55 y 60-70 kDa) de MMP-8 mediante análisis de imágenes de barrido.

Análisis de datos

Se analizó la prevalencia de diferentes formas moleculares de MMP-8 y proporciones de MMP-8 total a partir de imágenes de escaneo y se calculó para todos los pacientes. Los niveles de IFMA e IEMA de MMP-8, la cantidad absoluta de cada forma molecular de MMP-8 y sus proporciones, así como las combinaciones, se compararon mediante ensayos no paramétricos (ensayo de Mann-Whitney para comparaciones por pares, ensayo de Kruskall-Wallis para grupos múltiples y ensayo de Joncheere-Terpstra para tendencias en alternativas ordenadas) entre diferentes grupos de estudio y entre fumadores y no fumadores. La prevalencia/expresión de diferentes especies de MMP-8 kDa en diferentes grupos de estudio se analizó mediante la prueba de Chi cuadrado.

Se ejecutaron las siguientes regresiones logísticas no ajustadas y multiajustadas:

1) asociación de los niveles de IFMA e IEMA con prevalencia de diferentes especies de MMP-8 kDa (variables dependientes); en el análisis de regresión logística multiajustado, el número de dientes, el porcentaje de BOP y el número de bolsas de 4-5 mm y ≥ 6 mm como variables continuas y el tabaquismo como variables dicotómicas (sí/no).

2) asociación de prevalencia, proporción y unidades absolutas de escaneo de especies de MMP-8 kDa y sus combinaciones con altos niveles de IFMA e IEMA (\geq IFMA o IEMA media considerando el nivel n de dientes del Grupo 4 con fuerte carga inflamatoria periodontal); en modelo % BOP multiajustado y número de bolsas de 4-5 mm y ≥ 6 mm como variables continuas y tabaquismo como variable dicotómica (sí/no),

3) asociación de especies de MMP-8 kDa con un fuerte nivel de carga inflamatoria periodontal (Grupo 4); en el modelo % BOP multiajustado y número de bolsas de 4-5 mm y ≥ 6 mm como variables continuas y tabaquismo como variable dicotómica (sí/no), 4) asociación de especies de MMP-8 kDa con tabaquismo; en el modelo

multiajustado, n de dientes, BOP, n de 4-5 mm y bolsas \geq 6 mm como variables continuas.

Se elaboró un modelo para el reconocimiento de pacientes con una fuerte carga inflamatoria periodontal mediante un análisis de regresión logística por pasos hacia adelante. Se ensayaron los niveles IFMA e IEMA (considerando n número de dientes), el porcentaje de BOP y el estado de tabaquismo (sí/no) junto con la prevalencia, las cantidades absolutas y las proporciones de las especies MMP-8 de 21, 25 y 35 kDa una por una y como combinaciones.

5 Se realizó un análisis de la característica operativa del receptor (ROC) para evaluar la sensibilidad y especificidad diagnósticas de los niveles IFMA e IEMA de MMP-8 y la prevalencia de especies de 25+35 kDa en los grupos de estudio.

Se consideraron estadísticamente significativos los valores $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con IBM SPSS Statistics versión 20.

10 Resultados

La Tabla 1 muestra las características de los cuatro grupos de estudio en función de la carga inflamatoria periodontal. En los Grupos 1 y 2 había solo 4 (12,9%) y 3 (17,6%) fumadores, todos ellos fumando \leq 10 cigarrillos/día. En los Grupos 3 y 4 el tabaquismo era más habitual [20 (20,6%) y 23 (48,9%) respectivamente], y 10 (50%) pacientes en el Grupo 3 y 17 (73,9%) en el Grupo 4 fumaban $>$ 10 cigarrillos/día. El número de pacientes varones aumentó con el aumento de la carga inflamatoria periodontal ($p = 0,011$).

15 **Tabla 1.** Características de los grupos de estudio (Grupos 1-4)

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Valor-p
	N = 31	N = 17	N = 97	N = 47	
Género hombre n (%)	5 (16,1)	3 (17,6)	33 (34)	23 (48,9)	0,011*
Edad media (sd)	59 (8,6)	56,2 (7,3)	56,3 (6,9)	57,8 (9,0)	0,408**
N de dientes media (sd)	24,1 (4,6)	24,5 (3,9)	25,1 (4,2)	22,7 (5,7)	0,041**
% BOB med (IQR)	4,3 (4,2)	14,1 (4,0)	6,8 (9,5)	20,3 (14,4)	< 0,001§
Bolsillos de 4-5 mm medio (IQR)	-	-	2 (3)	9 (11)	< 0,001§
Bolsillos \geq 6 mm med (IQR)	-	-	0 (1)	2 (6)	< 0,001§
PIBI medio (IQR)	0	0	2 (3)	15 (19)	< 0,001§
n fumadores (%)	4 (12,9)	3 (17,6)	20 (20,6)	23 (48,9)	0,001*
n fumadores $>$ 10/día (%)	-	-	10 (50)	17 (73,9)	0,007*

*Ensayo de Chi-cuadrado ** Ensayo ANOVA §Kruskall-Wallis

Prevalencia, cantidades absolutas y proporciones de especie de MMP-8 kDa

20 En la Tabla 3 se presentan el porcentaje de prevalencia y los niveles medios (IQR) de la cantidad absoluta (unidades de escaneo) y las proporciones de diferentes especies de MMP-8 kDa para todos los grupos de estudio. La prevalencia y las cantidades absolutas de aquellas formas moleculares de MMP-8 que mostraron diferencias significativas entre todos los grupos de estudio, es decir, especies de 25 y 35 kDa, se presentan además en la Tabla 2 calculadas por separado para fumadores y no fumadores.

25 En el Grupo 4, tanto la prevalencia como la cantidad absoluta de especies de 25, 35 y 25+35 kDa era significativamente mayor entre los fumadores. La prevalencia de especies de 25 kDa difirió significativamente entre todos los Grupos ($p = 0,025$), y la prevalencia de 25+35 kDa tanto entre fumadores ($p = 0,011$) como entre no fumadores ($p = 0,046$) era mayor en el Grupo 4. Entre los no fumadores, la cantidad total de especies de 35 kDa difirió significativamente entre todos los Grupos de estudio. Cuando se analizaron las diferencias entre los Grupos combinados 1-3 frente al Grupo 4, en el Grupo 4 la prevalencia de especies de 25, 35 y 25+35 kDa de fumadores era significativamente mayor (valores p respectivos 0,011, 0,038 y 0,005).

Tabla 2. Prevalencia y cantidades absolutas de especies de MMP-8 de 25 y 35 kDa para fumadores y no fumadores en los Grupos de estudio 1-4. Valores P para prevalencia por Chi-cuadrado de Pearson; para cantidades absolutas por ensayo de Kruskall-Wallis (varios grupos independientes) y por ensayo de Mann-Whitney (dos grupos independientes)

Grupo		No fumadores			Fumadores			Valor p NF vs. F			
		25	35	25+35	25	35	25+35	25	35	25+35	
1	Prevalencia n (%)	23 (85,2)	24 (88,9)	21 (77,8)	3 (75)	3 (75)	3 (75)	0,605	0,43 9	0,901	
NF n=27	Cantidad media (unidades de escaneo)	0,37 (1,57)	0,62 (2,033)	1,41 (5,32)	0,31 (0,85)	1,41 (4,78)	1,72 (5,62)	0,589	0,75 5	0,842	
F n=4	(IQR)										
2 NF	Prevalencia n (%)	9 (64,3)	8 (57,1)	7 (50)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	0,218	0,15 9	0,110	
n=14	Cantidad media (unidades de escaneo)	0,29 (0,52)	1,17 (1,09)	0,83 (1,37)	0,97 (-)	0,30 (-)	1,61 (-)	0,04 7	0,50 9	0,244	
F n = 3	(IQR)										
3 NF	Prevalencia n (%)	45 (58,4)	48 (62,3)	36 (46,8)	12 (60)	14 (70)	11 (55)	0,900	0,52 5	0,511	
n=77	Cantidad media (unidades de escaneo)	0,17 (0,65)	0,18 (0,85)	0,67 (1,59)	0,19 (0,82)	0,38 (1,54)	0,66 (2,71)	0,978	0,34 2	0,646	
F n=20	(IQR)										
4	Prevalencia n (%)	17 (70,8)	16 (66,7)	14 (58,3)	22 (95,7)	22 (95,7)	22 (95,7)	0,02 4	0,01 2	0,003	
NF n=24	Cantidad media (unidades de escaneo)	0,19 (0,92)	0,12 (0,67)	0,26 (1,50)	0,34 (0,60)	0,93 (1,77)	1,49 (2,24)	0,03 2	0,00 2	0,014	
F n=23	(IQR)										

5

Valores-p				
1 a 4	Prevalencia	0,083	0,064	0,046
NF	Cantidad	0,162	0,035	0,054
	Prevalencia	0,02 5	0,109	0,011
F	Cantidad	0,160	0,475	0,549
1 a 3 vs. 4 NF	Prevalencia	0,598	0,914	0,713
	Total	0,971	0,258	0,312
	Prevalencia	0,01 1	0,038	0,005
	Cantidad	0,519	0,242	0,375
F				

Tabla 3. Prevalencia, unidades absolutas de barido y proporciones de formas moleculares de MMP-8 kDa en los grupos 1-4. Las cifras que hacen referencia a diferencias significativas en los grupos 1-4 están en negrita [para la prevalencia de especies de 35 kDa ($p = 0,031$), 25 kDa ($p = 0,006$) y 25+35 kDa ($p = 0,002$) (prueba de Chi-cuadrado); para la cantidad absoluta de especies de 35 kDa ($p = 0,042$) (prueba de Kruskall-Wallis)].

		Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4		
		N = 31			N = 17			N = 97			N = 47		
Forma molecular (kDa)	Prevalencia n (%)	Unidades de escaneo med(IQR)	Proporción med(IQR)	Prevalencia (%)	Unidades de escaneo med(IQR)	Proporción med(IQR)	Prevalencia n (%)	Unidades de escaneo med(IQR)	Proporción med(IQR)	Prevalencia n (%)	Unidades de escaneo med(IQR)	Proporción med(IQR)	
60-70	3 (9,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0,28)	5 (5,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (6,4)	0 (0)	0 (0)	
55	16 (51,6)	0,002	2,5 (8,1)	8 (47,1)	0 (0,36)	50 (51,5)	0,018	1,8 (20,5)	28 (59,6)	0,031	3,7 (10,8)		
		(0,35)					(0,18)				(0,22)		
45	7 (22,6)	0 (0)	0 (0,46)	5 (29,4)	0 (0,36)	0 (16,7)	25 (25,8)	0 (0,072)	0 (4,8)	17 (36,2)	0 (0,13)	0 (14,1)	
35	27 (87,1)	0,62 (2,28)	39,6 (53,1)	11 (64,7)	0,27 (1,13)	14,4 (47,3)	62 (63,9)	0,21 (1,03)	23,6 (66,2)	38 (80,9)	0,42 (1,29)	34,1 (63,9)	
25	26 (83,9)	0,37 (1,13)	28 (31,3)	12 (70,6)	0,35 (0,85)	7,8 (37,4)	57 (58,8)	0,18 (0,66)	20,5 (38,1)	39 (82,9)	0,26 (0,76)	21,5 (37,5)	
21	13 (41,9)	0 (0,82)	0 (24,4)	9 (52,9)	0,014 (0,62)	0,5 (29,8)	36 (37,1)	0 (0,19)	0 (22,8)	19 (40,4)	0 (0,23)	0 (14,6)	
25+35	24 (61,1)	1,41 (5,32)	84,7 (45,8)	10 (58,8)	0,96 (1,28)	50,8 (78,6)	47 (48,5)	0,67 (1,85)	70,8 (70,5)	36 (76,6)	0,77 (2,41)	72,1 (42,5)	

Tabla 4. Niveles de MMP-8 (IQR) medios analizados por IFMA e IEMA para todos los grupos de estudio y cuando se tienen en cuenta el número de dientes y el estado de tabaquismo. NF no fumador, F fumador.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	valor p*	valor p**	valor p\$
IFMA µg/l	436 (938)	283 (566)	331 (1085)	946 (1643)	0,147	0,035	0,035
IEMA µg/l	312 (691)	237 (401)	218 (771)	497 (940)	0,173	0,123	0,058
IFMA/n de dientes µg/l	16,3 (42,3)	10,5 (24,1)	12,9 (37,6)	38,2 (71,2)	0,070	0,075	0,016
IEMA/n de dientes µg/l	10,8 (30,4)	9,0 (16,9)	9,7 (28,2)	26,5 (40,9)	0,075	0,091	0,025
NF IFMA/n de dientes µg/l	15,6 (62,5)	11,9 (28,1)	17,5 (41,6)	40,0 (65,8)	0,053	0,031	0,010
F IFMA/n de dientes µg/l	26,7 (27,5)	6,4 (-)	10,9 (26,4)	30,4 (70,2)	0,393	0,974	0,436
NF IEMA/n de dientes µg/l	10,1 (36,8)	10,2 (20,0)	11,3 (30,8)	27,4 (37,2)	0,087	0,048	0,023
F IEMA/n de dientes µg/l	20,5 (21,8)	7,5 (-)	6,5 (12,9)	23,7 (43,1)	0,287	1,0	0,414

*Ensayo Kruskall-Wallis en los Grupos 1 a 4** Ensayo de Mann-Whitney entre los grupos 1-3 combinados vs. el Grupo 4
\$Ensayo de Joncheere-Terpstra en los Grupos 1-4

Niveles IFMA e IEMA de MMP-8

5 La correlación entre los resultados del análisis IFMA e IEMA era muy buena (coeficiente de correlación de Pearson 0,954, significativo a un nivel $p < 0,01$). El coeficiente de correlación de Pearson entre el análisis IFMA actual y el anterior (Leppilahti et al. 2011) era 0,627, significativo a un nivel $p < 0,01$.

10 La Tabla 4 presenta los niveles de MMP-8 analizados por IFMA e IEMA para todos los grupos de estudio y cuando se tuvieron en cuenta el número de dientes y el estado de tabaquismo. Hubo una tendencia significativa a través de los Grupos 1-4 de aumento de los niveles IFMA de MMP-8 cuando se ensayaron alternativas ordenadas ($p = 0,035$), y para IEMA una tendencia que alcanzó significancia ($p = 0,058$). Cuando se consideró el número de dientes, la tendencia tanto para IFMA como para IEMA era significativa ($p = 0,016$ y $p = 0,025$, respectivamente) a través de los Grupos 1-4. Cuando se compararon los niveles del Grupo 4 con los niveles de los Grupos 1-3, todas las comparaciones dieron resultados significativos con valores p de 0,035, 0,033, 0,013 y 0,011. Los niveles entre los Grupos 1-3 fueron similares (valores p de 0,643, 0,822, 0,647 y 0,816 respectivamente).

15 Cuando se tomó en consideración el tabaquismo, la tendencia se hizo más fuerte para los no fumadores: para IFMA $p = 0,020$ y para IEMA $p = 0,038$, y cuando también se consideró el número de dientes para IFMA $p = 0,010$ y para IEMA $p = 0,028$ (Tabla 4, Figura 1). No se encontró una tendencia significativa para los fumadores. Cuando se compararon los niveles de fumadores y no fumadores del Grupo 4 considerando el n de dientes con los niveles de fumadores y no fumadores de los Grupos 1-3, los niveles de IFMA e IEMA de los pacientes no fumadores del Grupo 4 fueron significativamente más altos que otros Grupos de estudio (valores p respectivos 0,009 y 0,013). Sin embargo, cuando los sujetos del estudio de los Grupos 3 y 4 se dividieron en no fumadores, pacientes que fumaban ≤ 10 cigarrillos/día o > 10 cigarrillos/día, aunque no se encontraron significancias estadísticas, la distribución en los fumadores $> 10/\text{día}$ era más amplia que en los pacientes fumadores $\leq 10/\text{día}$ y similar con los no fumadores, especialmente en el Grupo 4 (Figura 1).

Niveles de IFMA e IEMA en relación con diferentes especies de MMP-8 kDa

20 Los niveles de IFMA e IEMA eran significativamente más altos en los pacientes con especies de MMP-8 de 21 kDa (valores p respectivos 0,011 y 0,003; para los no fumadores 0,005 y 0,002; para los fumadores la diferencia no era significativa). Sin embargo, el tabaquismo no tuvo un efecto significativo en la prevalencia de especie de 21 kDa.

25 En el análisis de regresión logística multiajustado, los niveles de IFMA e IEMA se asociaron con la prevalencia de 21 kDa (para IFMA OR = 1, 95 % CI 1-1,001, $p = 0,008$; para IEMA OR = 1, 95 % CI 1-1,001, $p = 0,004$) y 21 combinados con 25 kDa (para IFMA OR = 1, 95 % CI 1-1,001, $p = 0,002$; para IEMA OR = 1, 95 % CI 1-1,001, $p = 0,001$) y junto con especies de 25 y 35 kDa (21-35 kDa) (para IFMA OR = 1, 95 % CI 1-1,001, $p = 0,002$; para IEMA OR = 1, 95 % CI 1-1,001, $p = 0,001$), pero no con la prevalencia de especies de 25 y 35 kDa solas. También la combinación de especies de 21+45 kDa asociadas con los niveles de IFMA e IEMA en el análisis de regresión logística no ajustado (para ambos OR = 1, 95 % CI 1-1,001, $p = 0,028$). De otras covariables en los análisis de regresión logística multiajustados, el tabaquismo se asoció significativamente con especies de 25, 35, 25+35, 21+35 kDa, y BOP con especies de 45, 21+45, 21-45, 25+45 y 35+45 kDa, tanto cuando IFMA como IEMA eran covariantes.

30 Además, se analizó la asociación de la prevalencia, la proporción de unidades de escaneo totales y absolutas de especies de MMP-8 kDa y sus combinaciones con niveles altos de IFMA (\geq que el nivel medio del Grupo 4 considerando el n de dientes). Cantidades absolutas (valores p para el análisis de regresión multiajustado entre

paréntesis) de 21 kDa ($p = 0,011$), 25 kDa ($p = 0,050$), 21+25 kDa ($p = 0,011$), 21+35 kDa ($p = 0,006$), 21+45 kDa ($p = 0,012$), 21-35 kDa ($p = 0,009$) y 21-45 kDa ($p = 0,010$), y cantidad total de MMP-8 ($p = 0,010$) asociadas con los altos niveles de IFMA (Figura 2A) tanto en el análisis de regresión no ajustado como en el multiajustado.

5 Se realizaron ensayos similares para niveles altos de IEMA; en el análisis de regresión multiajustado, las cantidades totales de 21 kDa ($p = 0,013$), 25 kDa ($p = 0,044$), 21+25 kDa ($p = 0,011$), 21+35 kDa ($p = 0,006$), 21+45 kDa ($p = 0,014$), 21-35 kDa ($p = 0,007$) y 21-45 kDa ($p = 0,008$), y MMP-8 total ($p = 0,007$) eran significativas.

Prevalencia de otras formas moleculares de MMP-8 en especies de 21 kDa

Se analizaron las prevalencias de especies de 25 y 35 kDa para sujetos positivos y negativos para especies de 21 kDa. Cuando se analizaron todos los sujetos del estudio juntos, la prevalencia de especies de 35 kDa era significativamente mayor en pacientes positivos para 21 kDa (89,6%) que en negativos (56,5%) ($p < 0,001$). Se encontraron diferencias significativas para especies de 25 kDa en el Grupo 3 con 88,3%/44,3% cuando la especie de 21 kDa era positiva/negativa ($p < 0,001$); en el Grupo 4 hubo valores respectivos para la especie de 35 kDa 94,7%/71,4% ($p = 0,046$) y para la especie de 25 kDa 100%/71,4% ($p = 0,011$) cuando la especie de 21 kDa era positiva/negativa.

15 Asociación de las formas moleculares IFMA, IEMA y MMP-8 con una fuerte carga inflamatoria periodontal

En el análisis no ajustado, la prevalencia de especies de 25 kDa (OR 2,566, IC del 95 % 1,114-5,909, $p = 0,027$), 25+35 kDa (OR 2,586, IC del 95 % 1,221-5,477, $p = 0,013$) y de 21-45 kDa (OR 3,10, IC del 95 % 1,121-8,568, $p = 0,029$) se asoció significativamente con una fuerte carga inflamatoria periodontal (Grupo 4). Sin embargo, la asociación no era significativa en los análisis multiajustados (la combinación de especies de 25+35 kDa alcanzó la significación, $p = 0,053$).

Tanto los niveles de IFMA como de IEMA se asociaron con una fuerte carga inflamatoria periodontal del Grupo 4 en análisis no ajustados; para IFMA OR 1, 95% CI 1,0-1,001, $p = 0,029$ y para IEMA OR 1, 95% CI 1,0-1,001, $p = 0,046$.

En cambio, las covariables %BOP y tabaquismo se asociaron fuertemente con la fuerte carga inflamatoria periodontal del Grupo 4 con valores $p < 0,001$ para %BOP y de $< 0,001$ a 0,002 para tabaquismo en todos los análisis.

25 Asociación de especies IFMA y MMP-8 kDa con el tabaquismo

La prevalencia de especies de MMP-8 de 35 y 25+35 kDa se asoció significativamente con el tabaquismo tanto en el análisis de regresión logística no ajustado como en el ajustado, con valores p respectivos de 0,033 y 0,008 en el modelo multiajustado. La especie de 45 kDa no era significativa en el análisis no ajustado, pero en el modelo ajustado apareció como protectora ($p = 0,033$) (Figura 3B).

30 También la proporción de 35 kDa ($p < 0,001$) así como las proporciones de combinaciones de especies de 25+35 ($p < 0,001$), 25-45 (0,003), 35+45 (0,010), 21-45 ($p = 0,012$) y 21+35 ($p = 0,002$) kDa asociadas con el tabaquismo (Figura 3C) (valores p respectivos del modelo multiajustado entre paréntesis después de cada especie de MMP-8 mencionada). La cantidad absoluta de cualquier especie de MMP-8 no se asoció significativamente con el tabaquismo. Número de bolsas de 4-5 mm asociadas significativamente con el tabaquismo en todos los análisis de regresión multiajustados.

Asociación entre %BOP y diferentes especies de MMP-8

En todos los sujetos del estudio, la prevalencia de la especie 45 kDa era mayor en pacientes con BOP $\geq 25\%$ que en aquellos con BOP $< 25\%$ ($p = 0,003$, Chi-cuadrado). La diferencia era estadísticamente significativa también para la cantidad absoluta de tipo de 45 kDa ($p = 0,002$) y en no fumadores ($p = 0,001$). Sin embargo, la prevalencia de sangrado al sondaje $\geq 25\%$ en el Grupo 1 era 0, en los Grupos 2 y 3 9,1% para ambos, y en el Grupo 4 81,8%. Por lo tanto, la mayoría de los casos de BOP $\geq 25\%$ pertenecían principalmente pertenecientes al Grupo 4. En el Grupo 4, la cantidad absoluta, la prevalencia y la proporción de la especie de 45 kDa era significativamente mayor (valor p 0,009, 0,022 y 0,037, respectivamente) en pacientes con BOP $\geq 25\%$ que en pacientes con BOP $< 25\%$. No se encontraron diferencias significativas entre los fumadores y los no fumadores del Grupo 4.

45 En el análisis de regresión logística no ajustado, la prevalencia del tipo MMP-8 45 kDa asociado con %BOP $\geq 25\%$ con OR 3,66, 95% CI 1,523-8,797, $p = 0,004$. En el análisis de regresión logística multiajustado, la prevalencia del tipo 45 kDa asociada con BOB $\geq 25\%$ con OR 3,36, 95% CI 1,309-8,634, $p = 0,012$. Otras covariables no fueron significativas. No hay otras formas moleculares de MMP-8 asociadas con BOP $\geq 25\%$.

Modelado y análisis de las características operativas del receptor

50 Mediante un análisis de regresión logística por pasos hacia adelante, se ejecutó un modelo para el reconocimiento de pacientes con una fuerte carga inflamatoria periodontal (Grupo 4) a partir de muestras de enjuague bucal. Junto con IFMA e IEMA (teniendo en cuenta la cantidad de dientes), se probaron la prevalencia de %BOP y estado de tabaquismo (sí/no), las cantidades absolutas y las proporciones de las especies de 21, 25 y 35 kDa una por una y como combinaciones. El mejor modelo era la combinación de %BOP, estado de tabaquismo junto con la prevalencia

de especies de 25+35 kDa con valores p respectivos < 0,001, 0,006 y 0,044.

Se realizó un análisis de la característica operativa del receptor (ROC) para evaluar la sensibilidad y especificidad diagnósticas de los niveles de IFMA e IEMA de MMP-8 y la prevalencia de especies de 25+35 kDa en los grupos de estudio. La distinción era significativa para IFMA, IEMA y especies de 25+35 kDa para el Grupo 4 como variable de estado (Figura 4). Para IFMA en el Grupo 4, el área bajo la curva ROC era 0,602, intervalo de confianza (IC) del 95% 0,507-0,698 y valor p 0,035; para IEMA, el área bajo la curva ROC era 0,604, 95% CI 0,510-0,697 y valor p 0,033; para la prevalencia de 25+35 kDa, el área bajo la curva ROC era 0,604, 95% CI 0,514-0,693 y valor p 0,033; para %BOP, el área bajo la curva ROC era de 0,880, 95% CI 0,832-0,928 y valor p 0,025. El análisis ROC reveló que los productos de activación de MMP-8 de 25+35 kDa, junto con el análisis IFMA e IEMA, identificaban a los pacientes con periodontitis que se diferenciaban claramente de las especies de MMP-8 de 55-70 kDa que no lo hacían.

Ejemplo 2

Se realizó un análisis SDS-PAGE (10 %) según Kiili M et al. (2002).

Las cantidades de rhMMP-8 y los tiempos de incubación se indican en la Fig. 4. La Fig. 4A muestra los efectos de la APMA organomerkrial y la Fig. 4B muestra los efectos de los activadores oxidativos de NaOCl sobre la MMP-8 humana recombinante (Proteaimmun). Tanto la APMA como el NaOCl inducen la generación de especies de MMP-8 de menor peso molecular tras la activación. La formación dependiente del tiempo del fragmento de activación de 20-30 kDa se indica con una flecha.

El análisis de inmunotransferencia Western se realizó utilizando el método de inmunotransferencia Western descrito anteriormente. La Fig. 4C muestra el análisis de inmunotransferencia Western utilizando el anticuerpo monoclonal anti-MMP-8 1491-E6-F7 de rhMMP-8 activado (antígeno MMP-8 de Proteaimmun, Merck e Invent) mediante APMA y NaOCl y diferentes fluidos corporales humanos, así como suero.

Se utilizaron muestras de líquido gingival crevicular (GCF) de periodontitis humana; líquido sulcular de peri-implantitis humana (PISF); GCF de diente humano tratado con ortodoncia; saliva de periodontitis humana; enjuague bucal de periodontitis humana; muestras infectadas de líquido amniótico humano; líquido cefalorraquídeo de meningitis humana y suero de sepsis humana en los carriles 10 a 17 como se indica a continuación.

Carril 1: rMMP-8 Proteaimmun;

Carril 2: como carril 1 más APMA;

Carril 3: como carril 1 más NaOCl;

Carril 4: rhMMP-8 de Merck;

Carril 5: como carril 4 más APMA;

Carril 6: como carril 4 más NaOCl;

Carril 7: antígeno MMP-8 Invent;

Carril 8: como carril 7 más APMA;

Carril 9: como carril 7 más NaOCl;

Carril 10: fluido crevicular gingival de periodontitis humana (GCF);

Carril 11: fluido sulcular de peri-implantitis humana (PISF);

Carril 12: GCF de diente humano tratado mediante ortodoncia;

Carril 13: saliva de periodontitis humana;

Carril 14: enjuague bucal de periodontitis humana;

Carril 15: líquido amniótico humano infectado;

Carril 16: líquido cefalorraquídeo de meningitis;

Carril 17: suero de sepsis humana.

El fragmento prevalente de 20-30 kDa formado tras la activación de MMP-8 está indicado por la flecha.

Ejemplo 3

Se realizó un análisis de inmunotransferencia Western utilizando el método de inmunotransferencia Western descrito anteriormente utilizando muestras de líquido amniótico humano no infectadas (#16) e infectadas (#12, #13 y #19). A continuación se muestran las diferentes muestras y las diferentes concentraciones de MMP-8 evaluadas con IFMA utilizadas para el análisis para cada carril. Los geles utilizados fueron del 11%. Los ensayos se realizaron utilizando

tres anticuerpos diferentes, los anticuerpos monoclonales específicos de MMP-8 1491-E6-F7 (7.) y 1492-B3-C11 (4.) (Medix Biochemica, Kauniainen, Finlandia) y un anticuerpo policlonal (3.) (Lauhio A et al., 1994). En otros aspectos, los carriles son los mismos para todos los anticuerpos utilizados, pero no hay muestras en los carriles 8 y 10 para el anticuerpo policlonal anti-MMP-8. Los resultados se muestran en la Fig. 5. Los niveles de los fragmentos MMP-8 25kDa + 35kDa se correlacionaron con los niveles de MMP-8 evaluados con IFMA.

5

Carril 1.	Patrón
Carril 2.	#16, 210 µg/l MMP-8 (14 µl × 15 µg/l)/pocillo
Carril 3.	#12, 210 µg/l MMP-8
Carril 4.	#12, 2000 µg/l MMP-8
Carril 5.	#12, 40000 µg/l MMP-8
Carril 6.	#12, 76160 µg/l MMP-8 (14 µl × 5440 µg/l)/pocillo
Carril 7.	#13, 210 µg/l MMP-8
Carril 8.	#13, 2000 µg/l MMP-8
Carril 9.	#13, 40000 µg/l MMP-8
Carril 10.	#13, 186088 µg/l MMP-8 (14 µl × 13292 µg/l)/pocillo
Carril 11.	#19, 210 µg/l MMP-8
Carril 12.	#19, 2000 µg/l MMP-8
Carril 13.	#19, 40000 µg/l MMP-8
Carril 14.	#19, 127666 µg/l MMP-8 (14 µl × 9119 µg/l)/pocillo

Ejemplo 4

Se realizó un análisis SDS-PAGE (10 %) según Kiili M et al. (2002).

10 La MMP-8 humana recombinante (Proteaimmun) era activada por APMA y las cantidades de rhMMP-8 y los tiempos de incubación se indican a continuación. Las bandas utilizadas para la secuenciación se muestran en la Fig. 6.

Carril 1.	1,5 µl de patrón de peso molecular (Bio-Rad)
Carril 2.	2 µl de patrón de peso molecular (Bio-Rad)
Carril 3.	1 µl de MMP-8 (0,15 µg/µl) + 3 µl de tampón TNC (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8; NaCl 0,2 M; CaCl ₂ 0,75 mM)
Carril 4.	vacío
Carril 5.	1 µl MMP-8 (0,15 µg/µl) + 4 µl APMA 2mM + 3 µl tampón TNC, tiempo de incubación 2 h (37°C)
Carril 6.	vacío
Carril 7.	1 µl MMP-8 (0,15 µg/ µl) + 4 µl APMA 2mM + 3 µl tampón TNC, tiempo de incubación 5,5 h (37°C)

La secuenciación se realizó según el método de secuenciación descrito anteriormente. Se secuenciaron las bandas de gel 1 a 8 de la Fig. 6. El tamaño de las bandas era:

15

Banda 2 = 32 kDa

16 Banda 3 = 25 kDa

Banda 4 = 21 kDa

Banda 5 = 25 kDa

Banda 6 = 21 kDa

Banda 7 = 12 kDa

17

Banda 8 = 5 kDa

Las bandas 3, 4, 5 y 8 comprendían la SEQ ID NO: 1 y las bandas 2, 3, 4, 5 y 6 comprendían la SEQ ID NO: 2. La banda 7 identificó otros fragmentos de MMP-8. No se identificaron fragmentos de MMP-8 en la banda 1. Los productos

20

de activación de MMP-8 de las bandas 3, 4 y 5 comprendían tanto la SEQ ID NO: 1 como la SEQ ID NO: 2. Los aminoácidos 119-132 de la SEQ ID NO: 1 y los aminoácidos 151-165 de la SEQ ID NO: 2 eran del dominio de la región media de la secuencia total de MMP-8.

Ejemplo 5

5 Se realizó un análisis SDS PAGE y un análisis de inmunotransferencia de Western en aMMP-8 humana purificada extraída de placenta humana con anticuerpos monoclonales utilizados en los Ejemplos 2 y Ejemplo 3 para mostrar los fragmentos.

10 El anticuerpo anti-hMMP-8 (anti-hMMP8 de ratón MoAB 1491-E6-F7 (Medix Biochemica)) se unió a NHS-sefarosa (NHS-sefarosa activada 4 Fast Flow (GE Healthcare)) para las columnas de cromatografía de afinidad (columna de sefarosa de 30 ml (Bio Rad)). La concentración de la materia prima de placenta (extracto de placenta de MMP-8 humana (in.vent.Diagnostica)) se realizó mediante concentradores centrífugos (Vivaspin® Turbo 15 y Vivaspin® 2 (Sartorius)). La cromatografía de afinidad se realizó utilizando 10 ml por serie de extracto de placenta cruda concentrado (electroforesis en gel "Mini Protean 3 cell" e instrumento de transferencia "Mini Trans-Blot cell" (Bio Rad)). La elución ácida se realizó con un tampón de ácido cítrico pH 2,2. Se recogieron fracciones de 5 ml. Las fracciones se agruparon y se concentraron en concentradores centrífugos. La composición del tampón se ajustó (minidializador MD 1000 (Scienova)), para obtener aMMP-8 humana purificada. Se realizaron SDS-PAGE (Pierce Silver Stain Kit (Thermo Scientific)) e inmunotransferencia de Western Blot (Immun-Blot PVDF Membrana 0,2 µm 7x8,4 cm (Bio Rad) utilizando los patrones de proteína Precision Plus Protein Dual Xtra (BioRad)). Para SDS-PAGE y WB SDS se utilizaron geles con 12 % de gel de separación y 4 % de gel de recolección.

15 20 Los resultados se muestran en la Fig. 7 SDS-PAGE y en la Fig. 8 inmunotransferencia de Western.

25 El gel teñido con plata SDS-PAGE muestra bandas comparables en todas las muestras, mostrando predominantemente fragmentos de 10 a 15 kDa y de 20 a 35 kDa junto con los fragmentos conocidos hasta ahora por encima de 35 kDa. Las bandas de inmunotransferencia de Western rodeadas con un círculo eran relativamente débiles, sin embargo podían verse en la transferencia original. Las bandas de 75 y 25 kDa marcadas con "*" del marcador de peso molecular son rojas y claramente visibles en la inmunotransferencia original. La inmunotinción amplifica los fragmentos de 10 a 15 kDa y marca también los fragmentos de 20 a 35 kDa en muestras de mayor concentración.

Los resultados se correlacionan y confirman los resultados mostrados en el ejemplo 2 y 3.

Referencias

- Dejonckheere E. et al., Matrix metalloproteinase-8 has a central role in inflammatory disorders and cancer progression, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 22: 73-81, 2011.
- Hanemaaijer et al., Matrix Metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor- α and doxycycline, *J. Biol. Chem.* 278:40967-40972, 1997.
- Hemmilä et al., Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. *Anal Biochem* 137: 335-343, 1984.
- Holtfreter B. et al., Prevalence of periodontal disease and treatment demands based on a German dental survey (DMS IV), *Journal of Clinical Periodontology* Volume 37, Issue 3 Edición 3, páginas 9, March 2010.
- Kili M et al., Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue, *J. Clin. Periodontol.* 29:224-232, 2002.
- Lauhio A et al., In vivo inhibition of human neutrophil collagenase (MMP-8) activity during long-term combination therapy of doxycycline and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) in acute reactive arthritis, *Clin. Exp. Immunol.*, 98: 21-28, 1994.
- Leppilahti JM et al., Oral rinse MMP-8 point-of-care immune test identifies patients with strong periodontal inflammatory burden, *Oral Dis.* 17:115-122, 2011.
- Lindy O et al., Statin use is associated with fewer periodontal lesions: A retrospective study, *BMC Oral Health* 15; 8:16, 2008.
- Ma J. et al., Collagenases in different categories of peri-implant vertical bone loss. *J Dent Res*; 79: 1870-1873, 2000.
- Turunen et al., Recognition of *Porphyromonas gingivalis* Gingipain Epitopes by Natural IgM Binding to Malondialdehyde Modified Low-Density Lipoprotein, *PloS ONE* 7(4): e34910. Doi:10.1371/journal.pone.0034910, 2012.
- Xu L et al., Characteristics of collagenase-2 from gingival crevicular fluid and peri-implant sulcular fluid in periodontitis and peri-implantitis patients. *Acta Odont Scand*; 66: 219-224, 2008.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la activación de MMP-8 en una muestra, en el que el método comprende
 - a) proporcionar una muestra biológica obtenida previamente de un sujeto;
 - b) detectar la presencia de uno o más productos de activación de MMP-8 en la muestra biológica, en donde el producto de activación de MMP-8 es parte de MMP-8 activa, comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 y/o la secuencia SEQ ID NO: 2 y tiene un tamaño entre 10-35 kDa, preferiblemente 10-30 kDa, más preferiblemente 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa o 35 kDa;
 - c) correlacionar opcionalmente la presencia del producto de activación de MMP-8 con la presencia de MMP-8 activa en la muestra; y/o
 - d) correlacionar opcionalmente la presencia del producto de activación de MMP-8 con la presencia de otras partes más grandes de MMP-8 activa en la muestra;

en donde la presencia del producto de activación de MMP-8 en la muestra biológica es indicativa, confirmatoria y/o predictiva de la presencia de MMP-8 activa en la muestra.
2. El método según la reivindicación 1, en donde la muestra procede de la cavidad oral, fluido crevicular gingival, fluido sulcular periimplantario, placa oral, placa dental, enjuague bucal, colutorio, saliva, fluido del conducto radicular, exudado de la herida, pus, biopelícula oral, biopsias de tejido, exudados orales y sangre de lesiones orales.
3. El método según la reivindicación 1, en donde la muestra procede de líquido amniótico, suero, plasma, lavado vaginal, lavado nasal, seno nasal, seno auditivo, orina, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, heces, exudados, lágrimas, lavado (pulmón), biopsias de tejido y/o sudor.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la presencia de producto de activación de MMP-8 se determina utilizando un sistema de ligando para la detección de fragmentos de MMP-8 en la muestra biológica, en donde el sistema de ligando comprende uno o más anticuerpos, un par de anticuerpos y/o un fragmento de anticuerpo.
5. El método según la reivindicación 4, en donde el ensayo del sistema de ligando es un inmunoensayo cuantitativo, semicuantitativo o cualitativo elegido preferiblemente del grupo que consiste en inmunotransferencia Western, IFMA, EIA, IEMA, ELISA, ensayo de flujo lateral, ensayo de resonancia plasmónica de superficie y ensayo electroquímico.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la presencia del producto de activación de MMP-8 se determina utilizando una tecnología de detección directa de proteínas para detectar en la muestra biológica uno o más fragmentos de activación de MMP-8.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el método comprende además comparar los resultados obtenidos en la etapa b) con una muestra de referencia mediante la cual se va a diagnosticar una predisposición o un riesgo de padecer una enfermedad, relacionada con niveles elevados de MMP-8 activada o la progresión de la enfermedad, en donde
 - a) la muestra de referencia se deriva de un sujeto o un grupo de pacientes que actualmente se sabe que tiene un nivel normal de MMP-8, por lo que resultados similares para la muestra biológica y la muestra de referencia son indicativos de que el sujeto no tiene o no está predispuesto a padecer la enfermedad o no tiene o no está predispuesto a un riesgo de desarrollar o que progrese la enfermedad, y por lo que un nivel elevado del producto de activación de MMP-8 en la muestra biológica en comparación con la muestra de referencia es indicativo de que el sujeto tiene la enfermedad o está predispuesto a padecer la enfermedad o está predispuesto a tener un mayor riesgo de desarrollar o que progrese la enfermedad; o
 - b) la muestra de referencia se deriva de un sujeto o un grupo de pacientes que actualmente se sabe que tiene la enfermedad o está predispuesto a padecer la enfermedad, por lo que resultados similares para la muestra biológica y la muestra de referencia son indicativos de que el sujeto tiene o está predispuesto a padecer la enfermedad o tiene o está predispuesto a un riesgo de desarrollar o que progrese la enfermedad.
8. El método según la reivindicación 7, en donde la enfermedad es inflamación periodontal, pérdida de tejido periodontal (degradación), gingivitis, periodontitis, peri-implantitis, mucositis peri-implantaria, pérdida de dientes, remisión de implantes dentales, pérdida de hueso alveolar, mucositis, alteraciones de la membrana mucosa, inflamaciones periodontales apicales, inflamación del conducto radicular, caries, roturas verticales del hueso maxilar, movimiento dental ortodóncico, reacciones inflamatorias alérgicas y/o bacteriemia causadas por bacterias orales.
9. El método según las reivindicaciones 7 u 8, en donde la presencia del producto de activación de MMP-8 es indicativa o predictiva de enfermedades periodontales tales como periodontitis o peri-implantitis crónica o aguda; estas enfermedades orales son indicativas, potenciadoras o un factor de riesgo conocido de enfermedades o trastornos sistémicos como diabetes I, diabetes II, EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), enfermedades reumáticas,

artritis/enfermedades artríticas, osteoporosis, enfermedades ortopédicas, enfermedades autoinmunes, enfermedades de trasplante de tejidos, artritis, infección o remisión de prótesis terminales, enfermedades cardiovasculares tales como accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, arteriosclerosis, riesgos relacionados con el embarazo tales como parto prematuro, bajo peso al nacer, riesgos reproductivos tales como disfunción eréctil, recuento reducido de espermatozoides y menor movilidad de los espermatozoides.

5 10. El método según la reivindicación 7, en donde la enfermedad es una enfermedad ginecológica tal como inflamación intraamniótica, inflamación materna, enfermedades neonatales, parto prematuro, bajo peso al nacer, patologías amnióticas; una enfermedad cancerosa tal como neoplasias malignas, cáncer de mama y leucemias; una enfermedad

10 artrítica/reumática tal como artritis reumatoide, artrosis; una enfermedad diabética incluyendo todas las formas de diabetes mellitus, una enfermedad nefrológica, una enfermedad renal, una herida diabética que no cicatriza; una enfermedad ocular tal como queratocono, degeneración marginal pelúcida de la córnea; enfermedades

15 otorrinolaringológicas (por ejemplo, de oído, de los senos nasales); una infección o inflamación tal como borreliosis, sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), VIH, infección por H. Pylori, inflamación sistémica, inflamación sistémica de bajo grado, infecciones e inflamaciones pulmonares tales como bronquitis, bronquiectasias,

enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), infecciones/inflamaciones pediátricas; infecciones neurológicas, inflamaciones y enfermedades neurológicas como meningitis, enfermedad de Crohn; una enfermedad cardiovascular, como enfermedades vasculares, aterosclerosis como inflamación de placa intra-arterial, embolias y accidentes cerebrovasculares; una herida como heridas críticas, heridas que no cicatrizan y piel quemada; enfermedades intestinales (por pruebas fecales); una enfermedad después de traumas o accidentes; y/o síndrome metabólico y obesidad

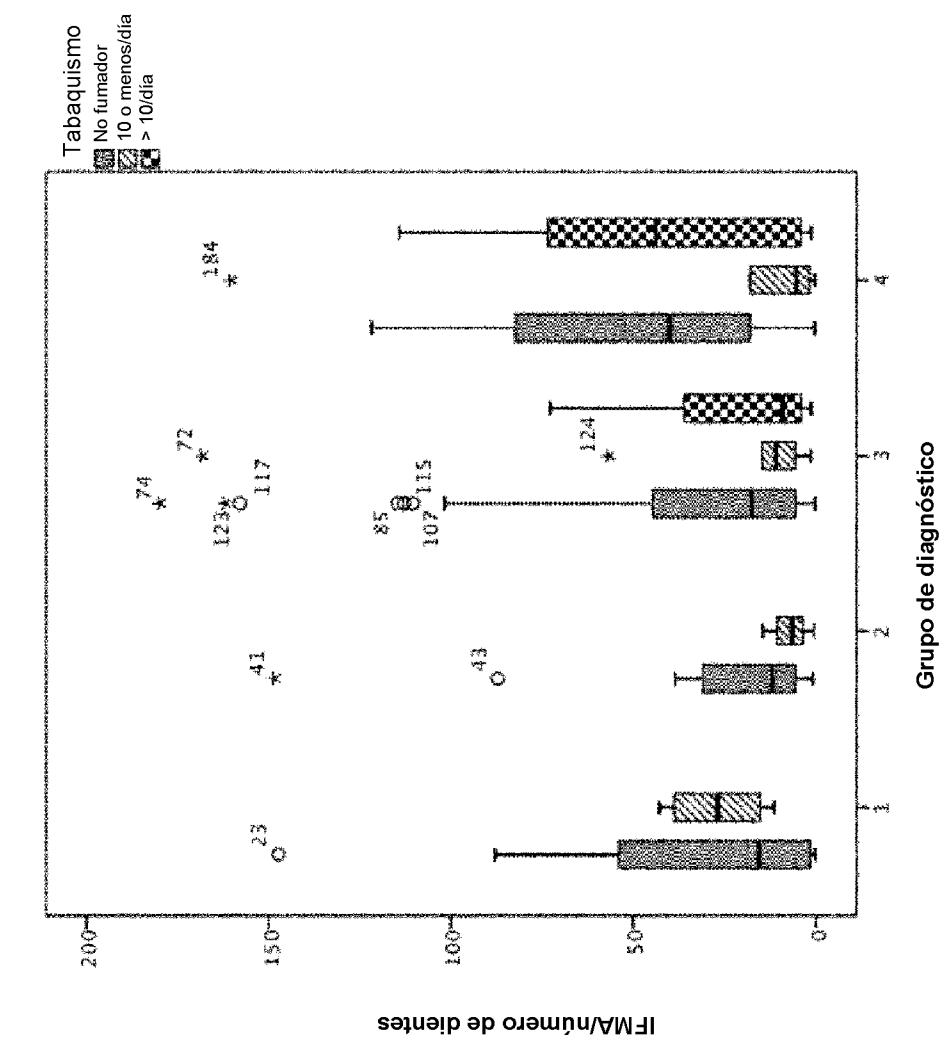
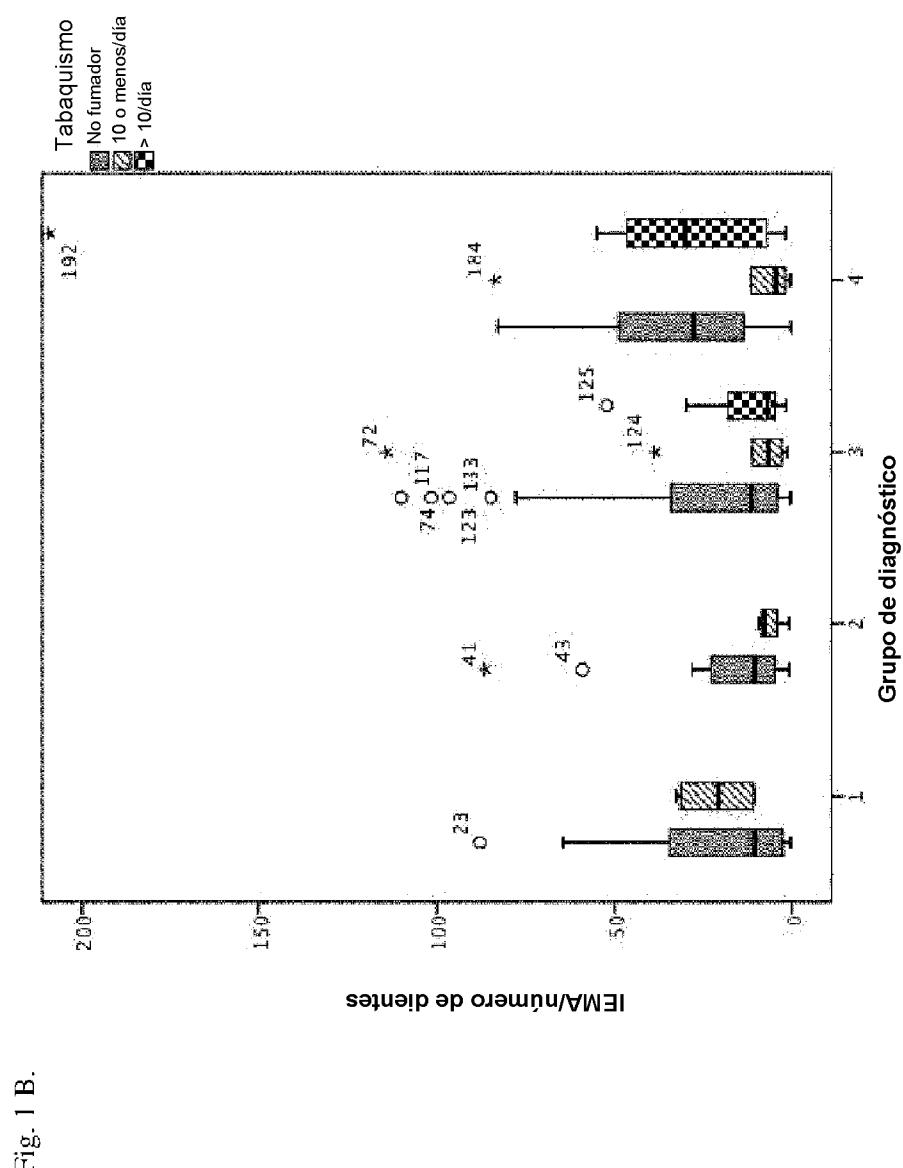
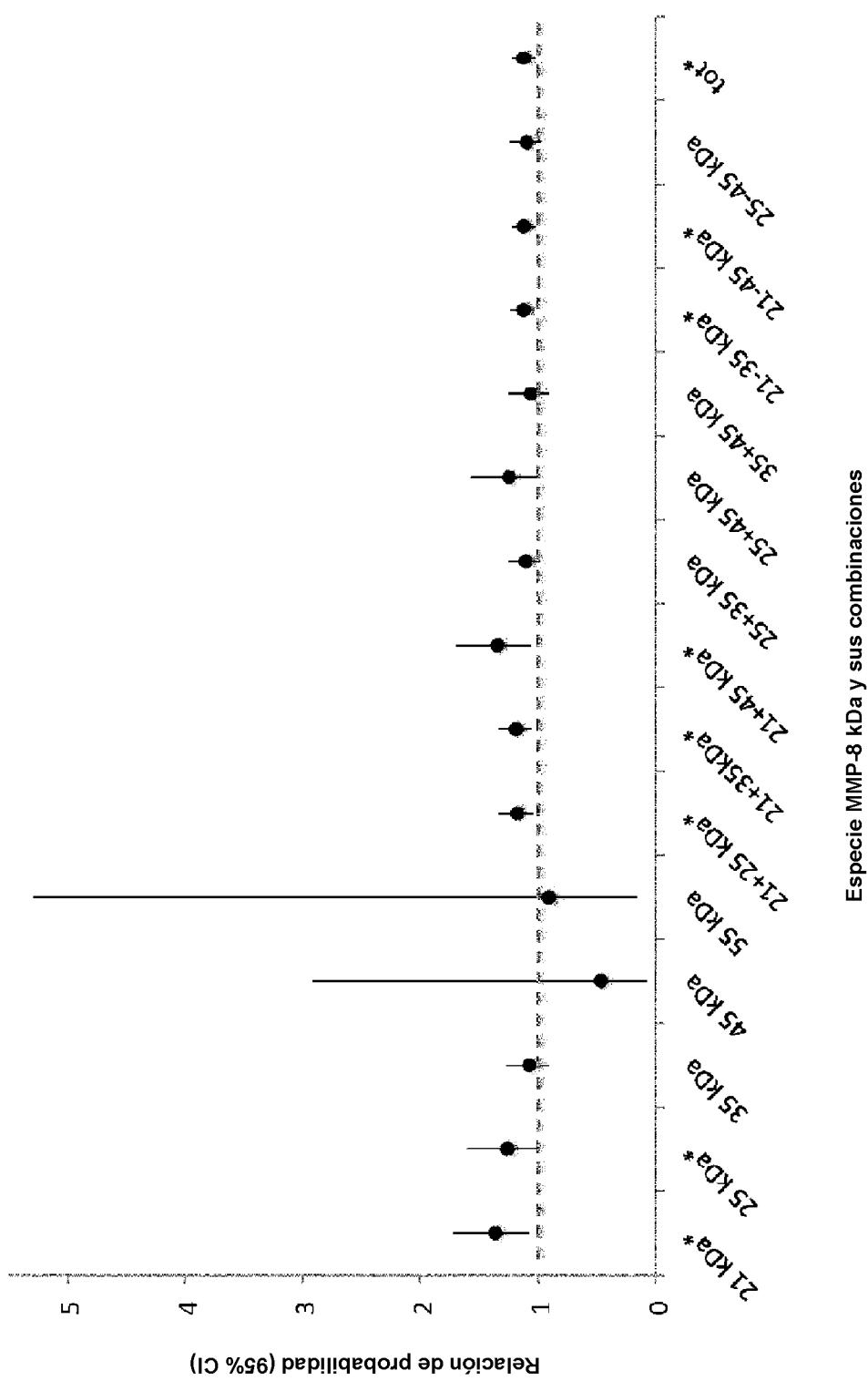
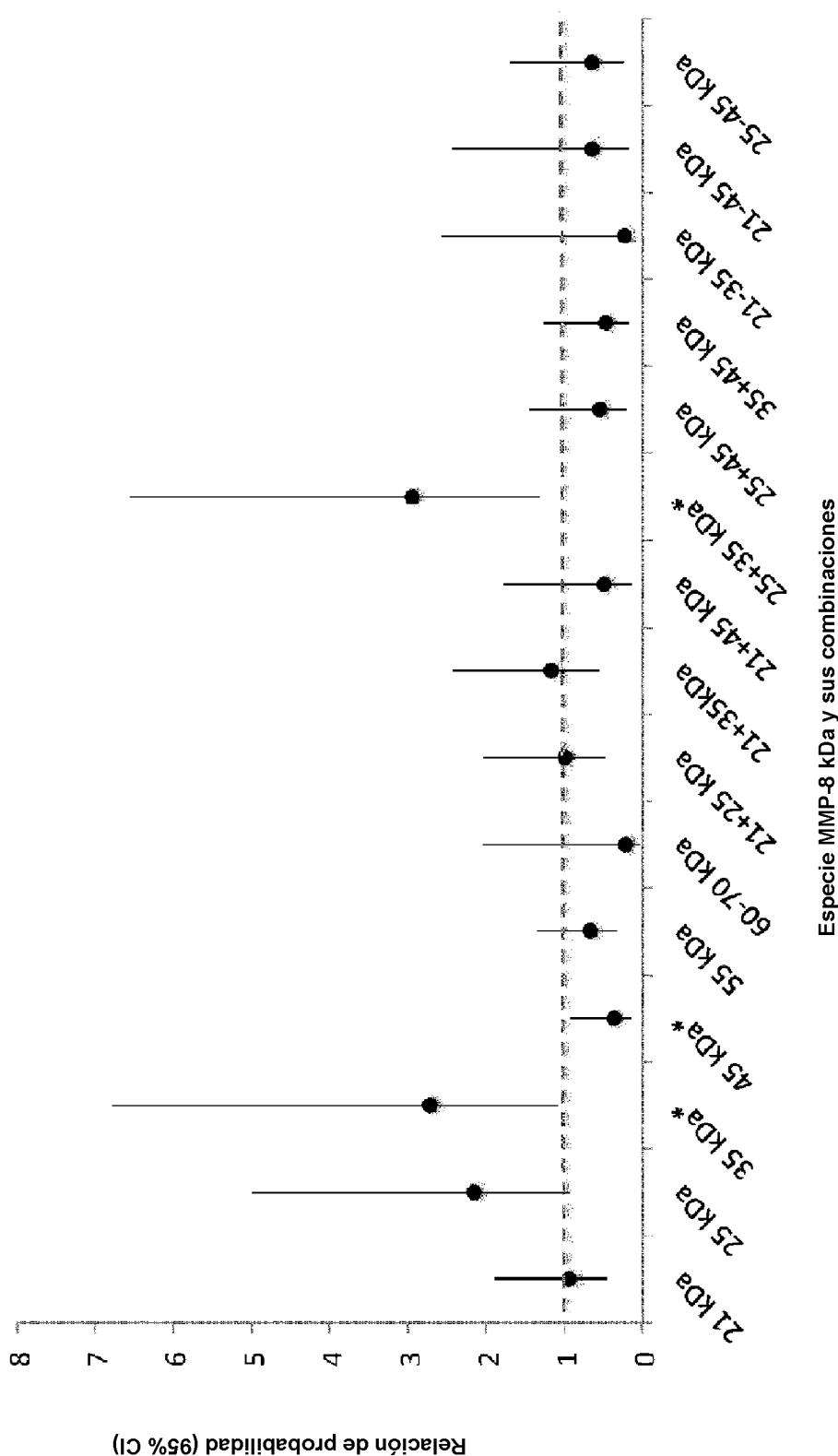


Fig. 1 A.



Fig.
2A

Fig.
2B

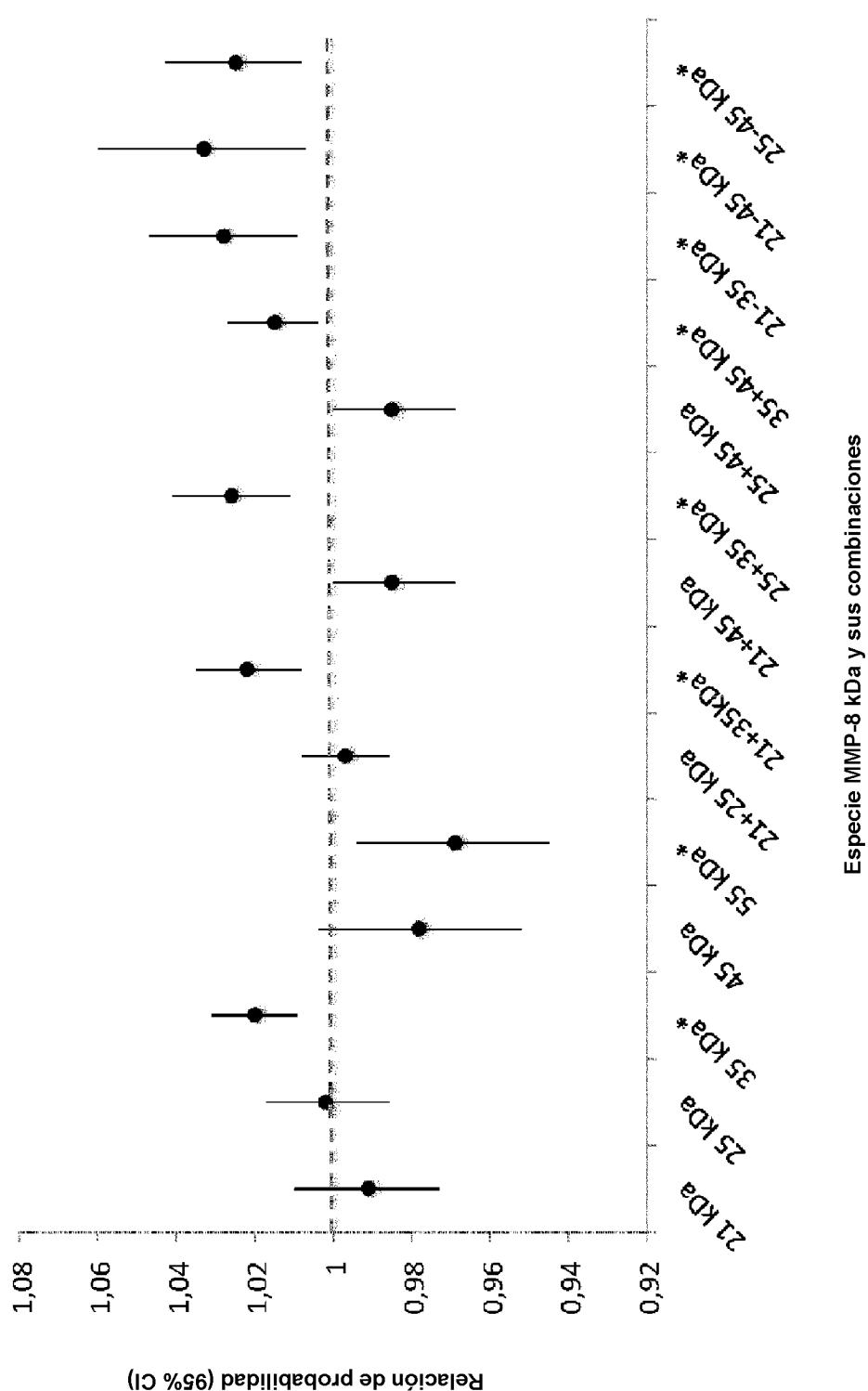
Fig.
2C

Fig. 3 A

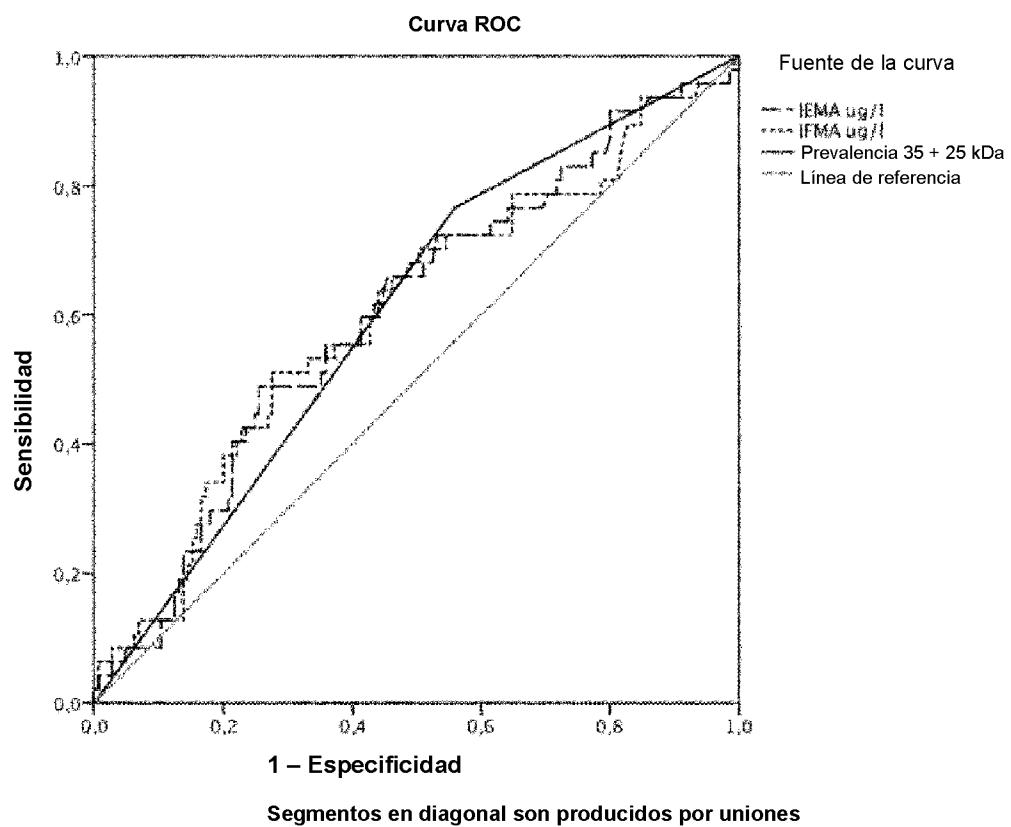


Fig. 3 B

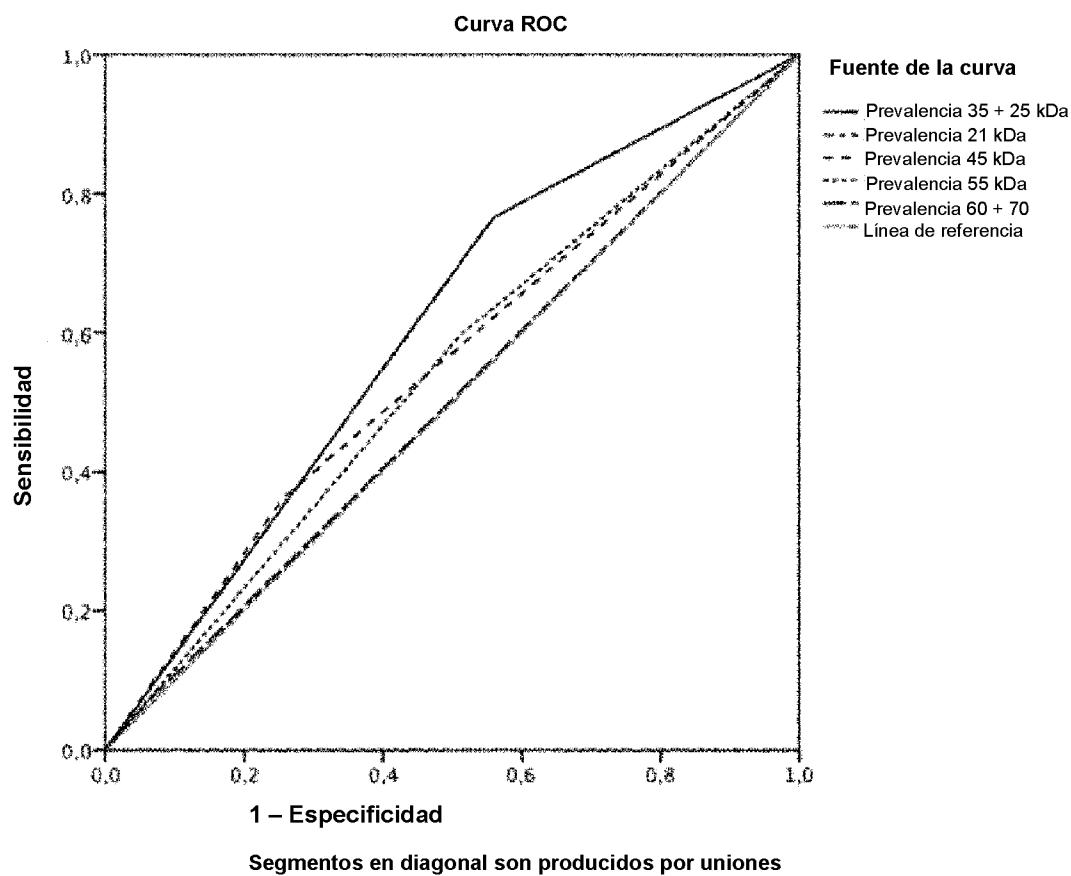
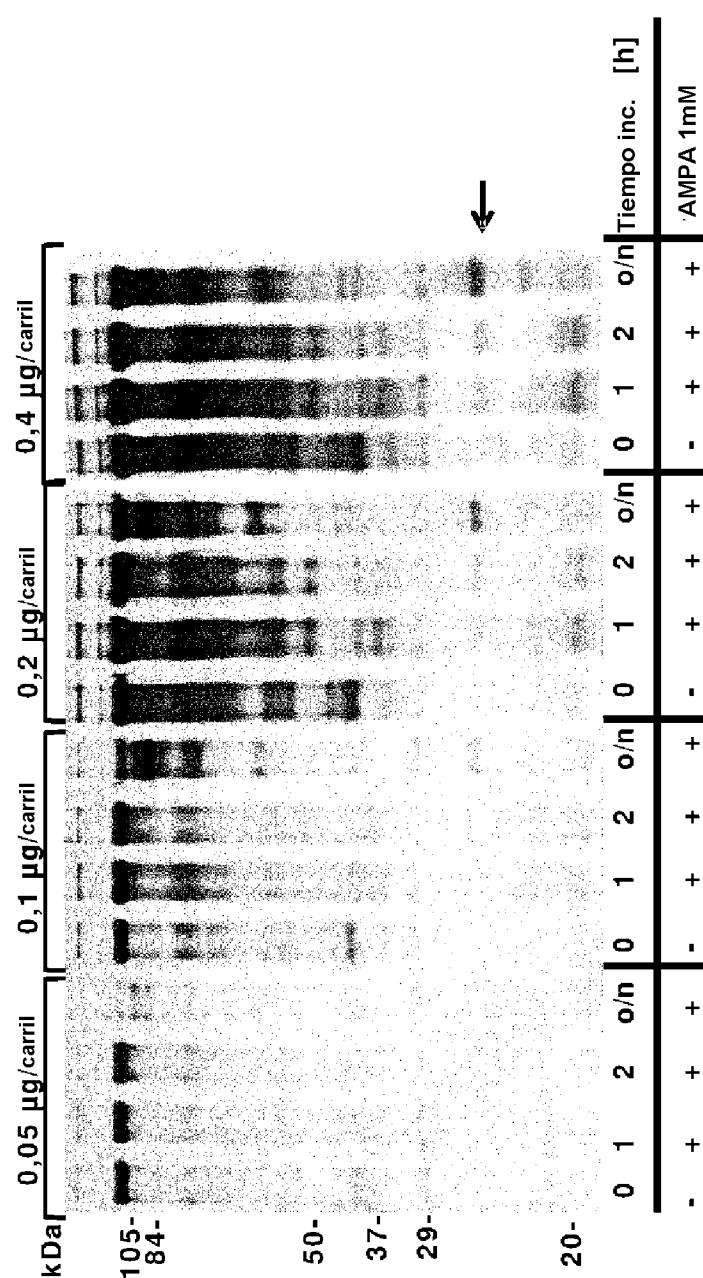


Fig. 4 A

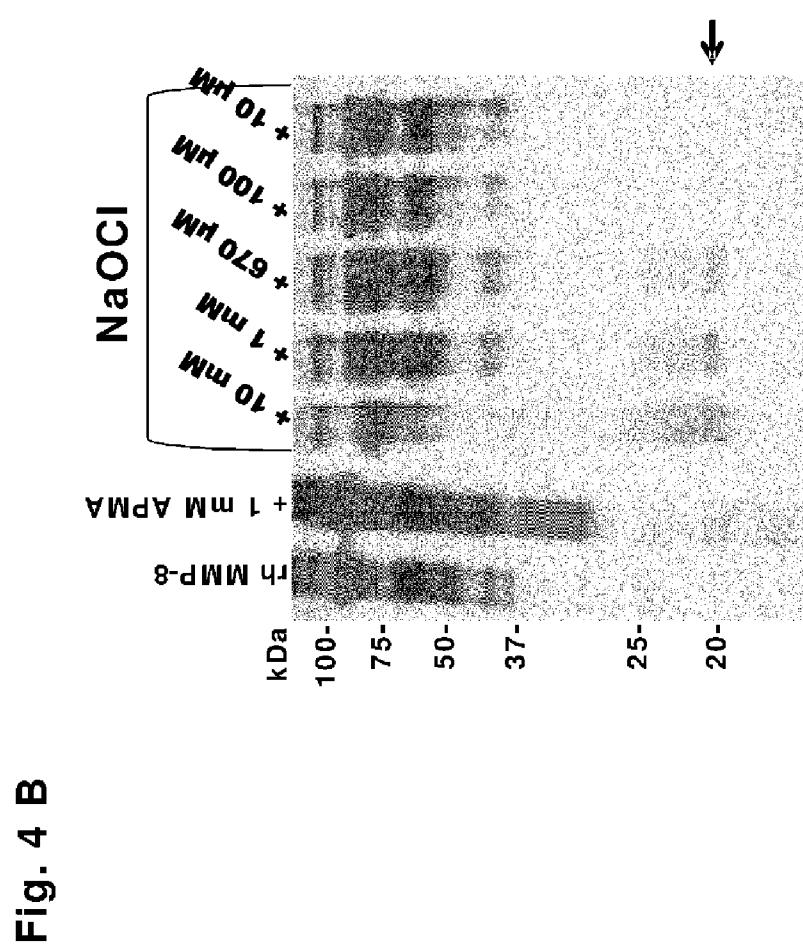
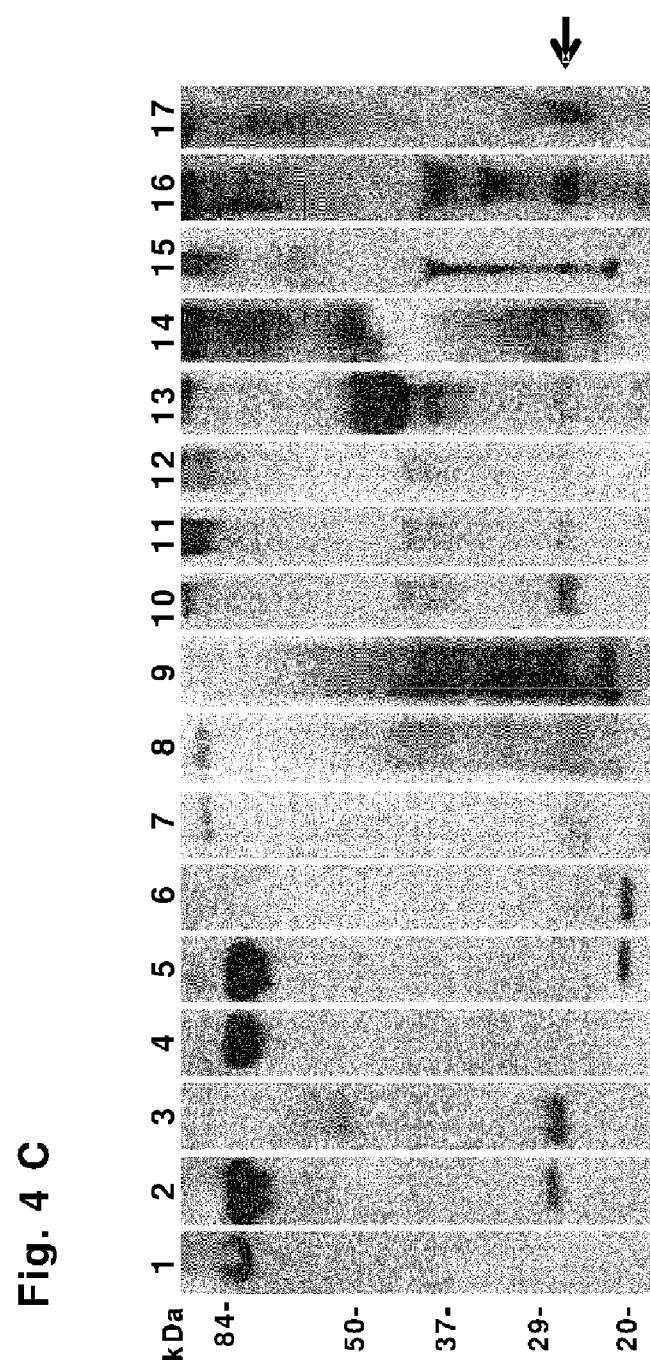


Fig. 4 B



ES 3 014 971 T3

Fig. 5

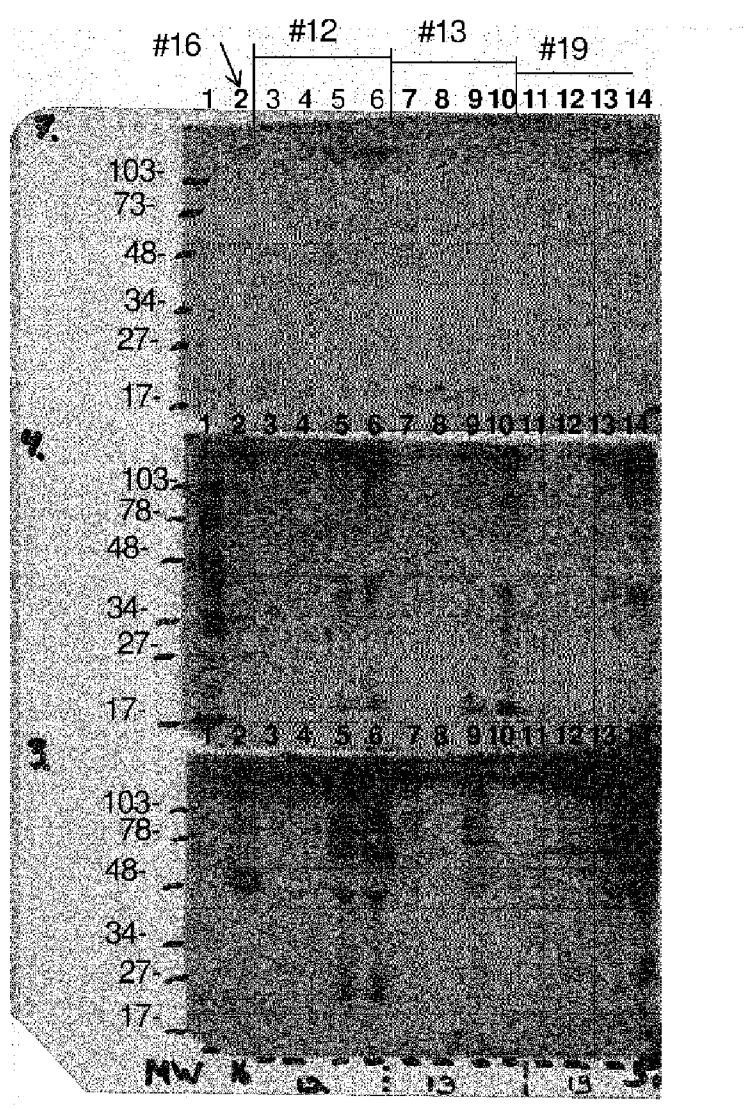
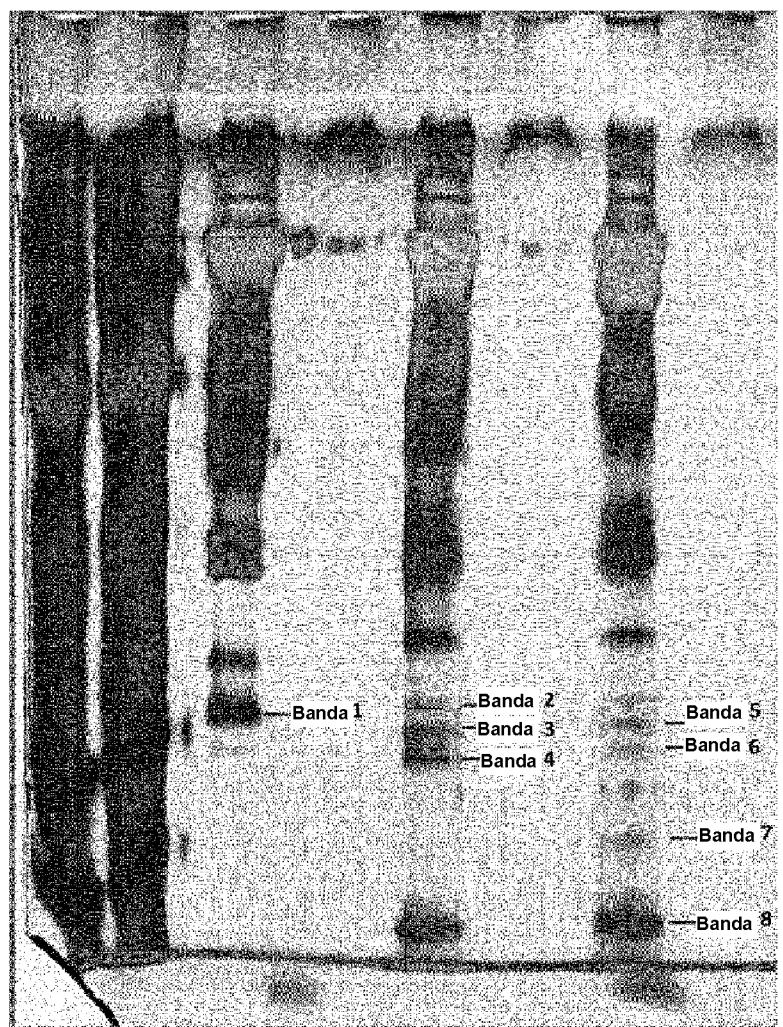
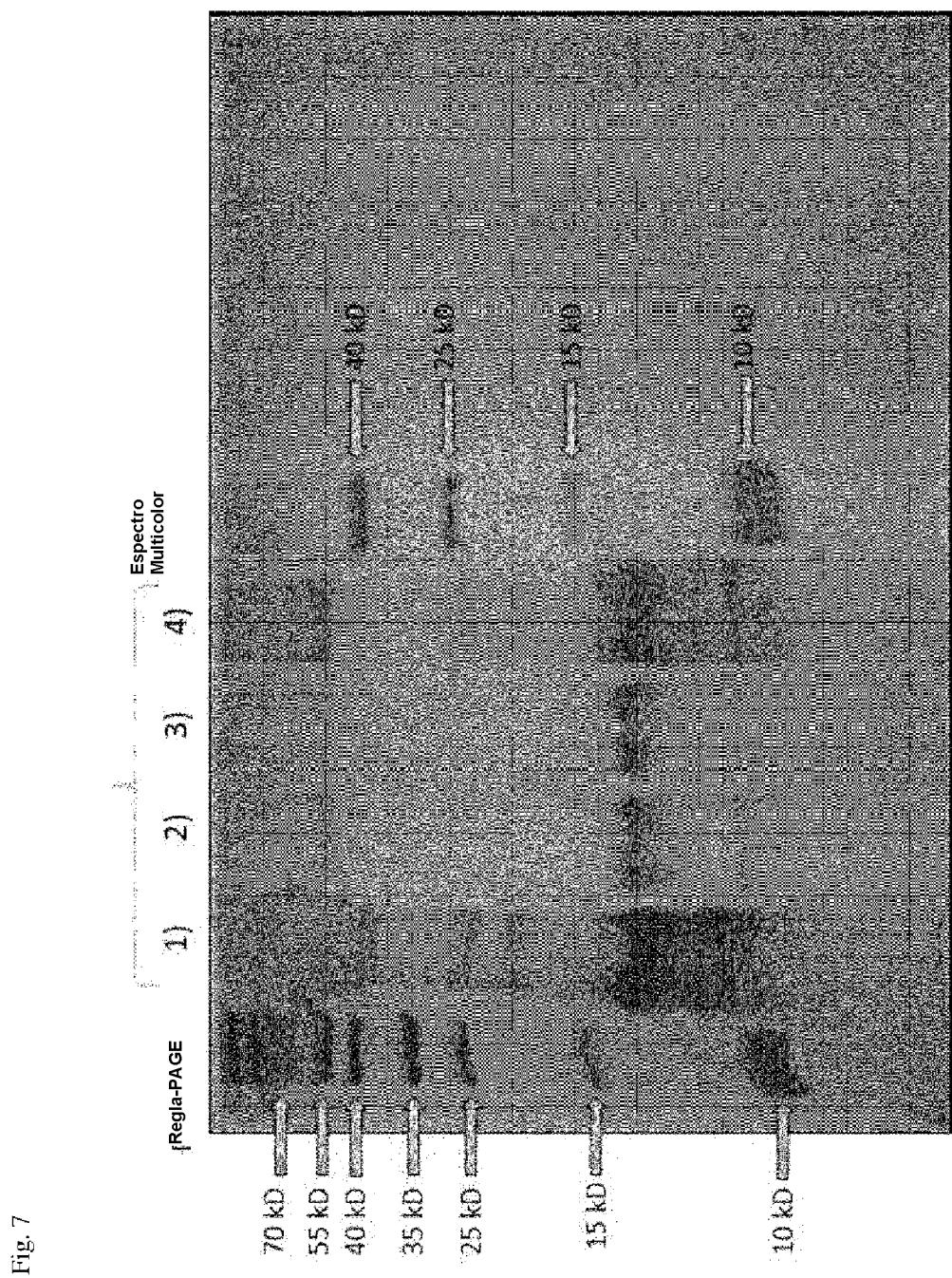


Fig. 6





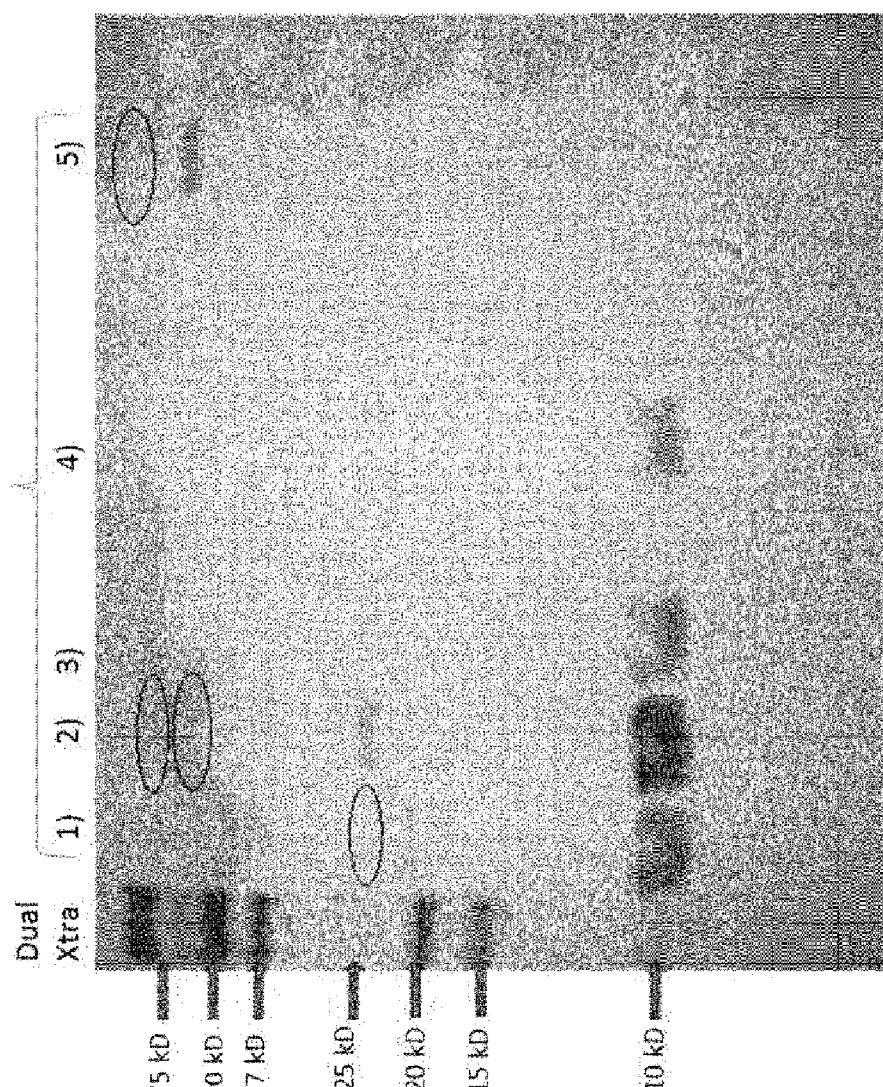


Fig. 8