

Expresión de Formas Solubles de MMP-14 y CXCL12 en Periodontitis Crónica Progresiva

Soluble Forms of MMP-14 and CXCL12 Expression in Progressive Chronic Periodontitis

Hernández M^{1,3}, Tervahartiala T², Rivera O³, Dezerega A³, Dutzan N³, Henríquez L³, Sorsa T²

RESUMEN

La pérdida de tejidos de soporte durante la periodontitis crónica se asocia con la infiltración de leucocitos inflamatorios y la expresión desregulada de MMPs. CXCL12 es una potente quimioquina, mientras que MMP-14 presenta actividad colagenolítica y además es capaz de activar a otras colagenasas, como las MMPs -8 y -13. En este estudio analizamos la expresión de MMP-14 y CXCL12 en FCG de sujetos con periodontitis crónica progresiva. **Materiales y métodos:** Se seleccionaron sujetos con periodontitis crónica progresiva y se tomaron muestras de FCG de sitios activos e inactivos (N=34). Mediante inmunowestern blot se caracterizaron las formas solubles de la MMP-14 y CXCL12. La MMP-14 se cuantificó mediante densitometría, mientras que los niveles de CXCL12 se determinaron mediante ELISA. **Resultados:** CXCL12 y MMP-14 se identificaron en todos los sujetos con progresión. En sitios activos la MMP-14 soluble demostró una tendencia a aumentar y se encontró una fuerte correlación positiva entre MMP-14 y CXCL12, mientras que en sitios inactivos no se encontró correlación alguna. **Conclusión:** MMP-14 aumenta conjuntamente con CXCL12 a nivel de sitios activos y esta asociación podría estar relacionada con la pérdida activa de soporte periodontal.

Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabíl. Oral Vol. 2(2); 46-49, 2009.

Palabras clave: MMP-14, CXCL12, periodontitis crónica progresiva.

ABSTRACT

Support tissue loss during chronic periodontitis is associated with inflammatory leukocyte infiltrates and upregulation of MMP expression. CXCL12 is a potent leukocyte chemoattractant and MMP-14 is a collagenase capable to activate other collagenases such as MMPs -8 and -13. In this study we analyzed the expression of MMP-14 and CXCL12 in GCF of subjects with progressive chronic periodontitis. **Materials and methods:** Chronic periodontitis subjects undergoing disease progression were selected. GCF samples were collected from active and inactive sites (N=34). Soluble MMP-14 and CXCL12 forms were characterized by immunowestern blot. MMP-14 was quantified by densitometric analysis and CXCL12 levels were determined by ELISA. **Results:** In active sites, soluble MMP-14 showed a tendency to increase and a strong positive correlation was found between MMP-14 and CXCL12, whereas in inactive sites, no correlation was found. **Conclusions:** MMP-14 increases together with CXCL12 in active sites and thus, interactions between these mediators could be associated with active loss of tooth support tissues.

Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabíl. Oral Vol. 2(2); 46-49, 2009.

Key words: MMP-14, CXCL12, progressive chronic periodontitis.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis crónica es una enfermedad infecciosa caracterizada por la pérdida de los tejidos de inserción dentarios; es decir, el ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar⁽¹⁾. Se propone que la progresión de la destrucción del tejido periodontal de soporte ocurre durante episodios cíclicos de actividad seguidos por períodos prolongados de quiescencia o inactividad^(2,3).

La infección bacteriana provoca una respuesta inmunoinflamatoria desregulada caracterizada por la secreción de citoquinas, quimioquinas y metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) por las células del hospedero⁽⁴⁾. El rompimiento inicial del colágeno constituyente del periodonto por las colagenasas, que incluyen las MMPs -1, -8, -13 y -14, es un hecho clave en la progresión de las lesiones periodontales^(5,6). Por otro lado, se ha demostrado una asociación entre el aumento de la expresión de las MMPs -13 y -14 y la ocurrencia de reabsorción ósea inflamatoria⁽⁷⁾. Además de su actividad colagenasa, la MMP-14 es capaz de activar a otras MMPs, como MMPs -2, -8 y 13⁽⁸⁻¹¹⁾. Si bien la MMP-14 se clasifica dentro de las MMPs de membrana plasmática, recientemente se han descrito formas solubles de la enzima en ciertos fluidos como esputo, lavados bronco alveolares, lagrimas y fluido crevicular gingival (FCG)^(6,10,12). Por otro lado, el factor derivado del estroma-1 (CXCL12/CX-

CL12) es una potente quimioquina capaz de promover el reclutamiento, desarrollo y supervivencia de osteoclastos⁽¹³⁾ y leucocitos inflamatorios y recientemente se demostró su expresión en el tejido gingival y niveles elevados en sujetos con periodontitis crónica en relación con controles⁽¹⁴⁾.

En la actualidad, el papel de las colagenasas en la progresión de la periodontitis crónica se ha estudiado ampliamente y como resultado, la MMP-8 y más recientemente la MMP-13, se han propuesto como un importantes marcadores de progresión de la enfermedad y posibles futuros blancos de terapia farmacológica⁽¹⁵⁻²⁰⁾. Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios referentes al papel de las formas solubles de la MMP-14 ni CXCL12 sobre lesiones activas en periodontitis crónica. En este estudio analizamos la expresión de MMP-14 y CXCL12 en FCG de sujetos con periodontitis crónica progresiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Sujetos con progresión

El procedimiento de selección de sujetos con periodontitis crónica progresiva se efectuó según se describió previamente en Hernández et al. (2006)⁽²⁰⁾. Se seleccionaron pacientes con periodontitis moderada a severa en el Servicio de Recepción de Pacientes de la Facultad

1. Profesor Asistente, Departamento de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

2. Departamento de Enfermedades Orales y Maxilofaciales, Hospital Central Helsinki, Instituto de Odontología, Universidad de Helsinki, Helsinki, Finlandia.

3. Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

de Odontología, Universidad de Chile y del SSMN, CDT Eloísa Díaz. La progresión de la periodontitis se definió por el método de la tolerancia de acuerdo con Haffajee et al. (1983)⁽²¹⁾. Los sitios activos presentaron una pérdida de inserción >2 mm durante un período de seguimiento de dos meses. Se consideraron como mínimo la presencia de dos sitios activos para clasificar al paciente como teniendo progresión de la periodontitis. En total, 17 sujetos desarrollaron progresión y se obtuvieron muestras de un sitio activo e inactivo en cada uno de ellos (N=34). El protocolo del estudio, previamente aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, se explicó a todos los pacientes y se firmó un consentimiento informado. El protocolo establece que dentro del período comprendido a las dos semanas siguientes a la detección de actividad de la periodontitis todos los pacientes serán sometidos a tratamiento periodontal. En los sitios a analizar, la pieza dentaria se aisló con algodones y se secó el sitio con aire con ayuda de la jeringa triple. Luego se introdujo una tira de papel absorbente (Periopaper, Proflow, Amityville, New York, USA) en el saco por 30 segundos. En total se tomaron 3 tiras por sitio y se eluyeron desde las tiras utilizando 75 μ l solución de NaCl 0,9%. Los eluidos se mantuvieron a -80°C hasta su utilización.

Immunowestern Blot

Se efectuaron "immunowestern blot" con el propósito de caracterizar las bandas correspondientes a la MMP-14 y CXCL12 -correspondientes a ambas isoformas, \square y \square - asociadas a periodontitis crónica progresiva. Alícuotas de eluidos de FCG se cargaron en geles SDS-PAGE al 11 y 15% para la MMP-14 y CXCL12, respectivamente en condiciones desnaturantes reductoras y/o no reductoras (Laemmli, 1970). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA) a 40 mA/gel por 1h. y se bloquearon las interacciones inespecíficas con leche al 5% en TBST 0,05% por 1 hora. Posteriormente se efectuaron 4 lavados de 15 minutos con TBST y las membranas se incubaron durante la noche con los siguientes anticuerpos primarios: Ac policlonal anti-MMP-14 (Biogenesis LTD, Poole, UK), 1:500 y monoclonal anti-CXCL12, 1:150 (R&D systems, Minneapolis) en TBST. Después de lavar la membrana con TBST, éstas se incubaron con los anticuerpos secundarios respectivos conjugados con peroxidasa por 1 h (Amersham Buckinghamshire, UK) diluido 1:1000 en TBST, según indicaciones del fabricante. Tras lavar se identificó una reacción positiva utilizando el kit de detección ECL según indicaciones del fabricante (Amersham Buckinghamshire, UK) y se expusieron en películas radiográficas (Hyperfilm, Amersham, Buckinghamshire, UK). Las bandas correspondientes a la MMP-14 se cuantificaron con un densitómetro y el programa Analyst (GS-700: Bio-Rad).

Determinación de los niveles de CXCL12

La concentración del CXCL12 en FCG se determinó utilizando un kit ELISA de captura "Quantikine" (R&D systems Minneapolis), según indicaciones del fabricante. El anticuerpo del ensayo es específico para CXCL12 \square , y presenta un grado bajo de reconocimiento de CXCL12 \square , no así para otras citoquinas. La concentración de CXCL12 se obtuvo a partir de una curva estándar mediante lectura a 450 nm. Los resultados se expresaron como pg/mL.

RESULTADOS

Se identificaron diversas formas moleculares correspondientes a formas solubles de la MMP-14 en condiciones no reductoras (Figura 1): bandas mayores a 100 kDa, formas de alrededor de 60 kDa y fragmentos de peso molecular inferior a 40 kDa. En el caso de CXCL12 (Figura 2) en condiciones no reductoras se identificaron formas de elevado PM, de alrededor de 100 kDa, que correspondieron a las bandas más prominentes y formas de alrededor de 50 kDa; mientras que en condiciones reductoras, se identificaron bandas de menor PM, donde las más prominentes presentaron un peso comprendido entre los 75 y 50 kDa y otras formas de menor tamaño correspondientes a 35 y 25 kDa aproximadamente.

Como se observa en la Figura 3A, los niveles totales de las formas solubles de la MMP-14 (correspondientes a la sumatoria de todas las inmunoreactividades identificadas para la MMP-14) tendieron a aumentar en sitios activos en comparación con los inactivos; sin em-

bargo las diferencias no fueron significativas mientras que los niveles de CXCL12 (Figura 3B) no variaron ($p>0,05$).

Es de interés que los niveles de MMP-14 y CXCL12 mostraron una correlación positiva en FCG de los sitios con progresión ($r=0,6$, $p=0,04$). Sin embargo, al analizar los grupos activos e inactivos por separado, como se observa en la figura 4, se encontró una fuerte correlación positiva entre MMP-14 y CXCL12 en los sitios activos ($r=0,89$, $p=0,02$); y por el contrario, no se observó correlación en sitios inactivos ($r=0,45$, $p=0,36$).

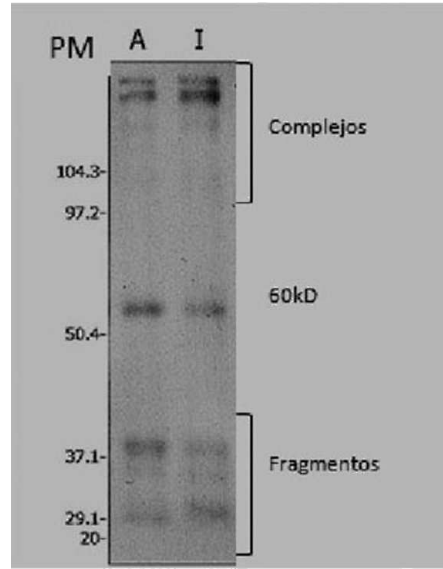


Figura 1. Formas solubles de la MMP-14 en FCG de sujetos con periodontitis crónica progresiva. A: sitios activos; I: sitios inactivos.

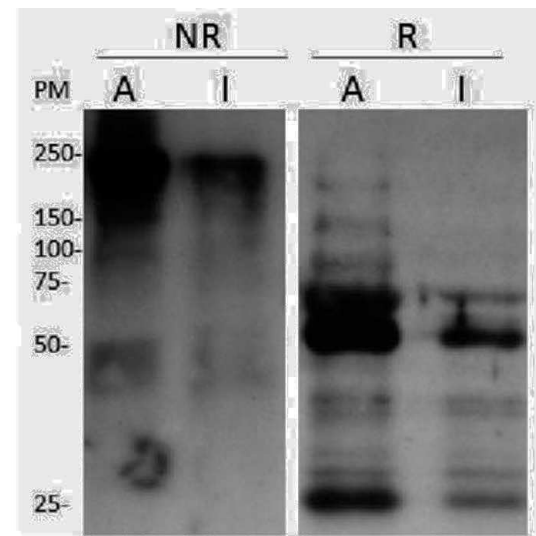


Figura 2. Formas moleculares del CXCL12 en FCG de sujetos con periodontitis crónica progresiva. Se realizaron immunowestern blots en condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R). A: sitios activos; B: sitios inactivos.

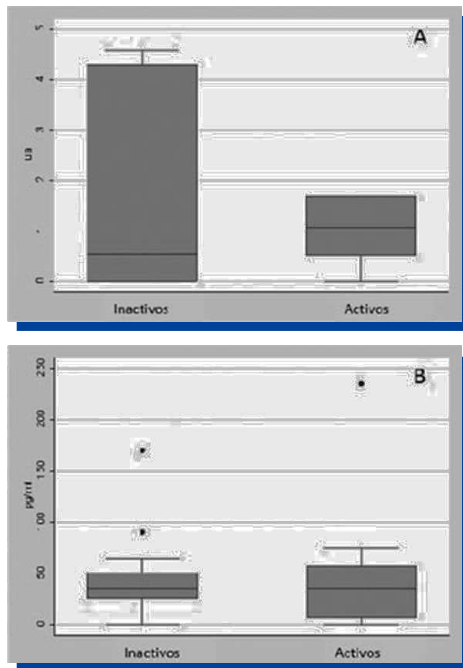


Figura 3A. Niveles de formas solubles de MMP-14 en FCG de sujetos con progresión.

Figura 3B. Niveles de CXCL12 en FCG de sujetos con progresión.

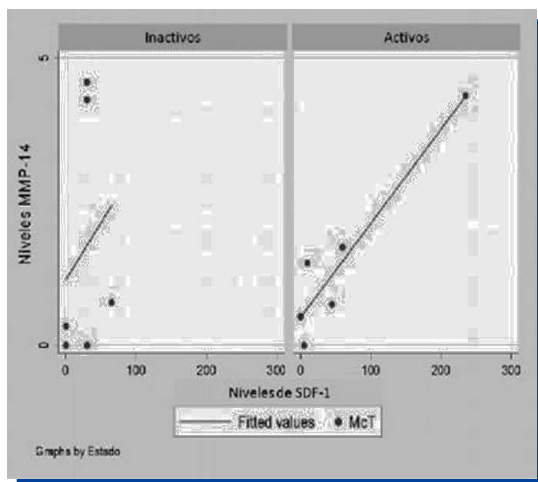


Figura 4. Correlación de Spearman entre niveles de formas solubles de MMP-14 y CXCL12 en FCG progresiva en sitios activos e inactivos. Sitios inactivos $r=0,45$, $p=0,36$; sitios activos, $r=0,89$; $p=0,02$.

DISCUSIÓN

La periodontitis crónica es una enfermedad que se desarrolla como resultado de la acción de una etiología heterogénea que incluye a un complejo biofilm bacteriano ubicado en el medio ambiente subgingival con la influencia y/o modulación de la respuesta inmune e inflamatoria desencadenada en los tejidos periodontales. Como resultado de la injuria, se producen cambios vasculares y celulares en los tejidos periodontales, la formación de un infiltrado inflamatorio con destrucción de la matriz extracelular y migración apical del epitelio de unión⁽²²⁾. Estos cambios se asocian con una mayor liberación de mediadores inflamatorios como citoquinas, quimioquinas, prostaglandinas y metaloproteinasas, ocasionando en definitiva la destrucción completa del ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar, lo que produce finalmente la pérdida del diente^(22,23). En este estudio, analizamos la expresión de las formas solubles de la MMP-14 y la quimioquina CXCL12 en el FCG

de sujetos con periodontitis crónica progresiva, tanto en sitios activos como inactivos. La identificación de MMP-14 y CXCL12 en todos los sujetos estudiados sustenta la hipótesis de que ambos mediadores puedan estar involucrados en la progresión de la enfermedad. Adicionalmente, el aumento conjunto de ambos mediadores en sitios activos sugiere la existencia de posibles mecanismos comunes de regulación y/o de interacciones entre estos.

En este estudio analizamos la expresión y se identificaron las formas solubles de la MMP-14 en el FCG de sujetos con progresión. En FCG de sitios activos, se observó una tendencia hacia el aumento de la MMP-14 en relación con sitios inactivos. En ambos casos, se identificaron complejos (mayores a 100 kD), formas entre 55-70 kD y fragmentos inferiores a 40 kD. Estas formas son similares a aquellas descritas previamente⁽⁶⁾ en periodontitis crónica no tratada y en otros fluidos orgánicos^(10,12,24). En el estudio de Tervahartiala et al (2000), se describió también la expresión de formas solubles de la MMP-14 en el FCG de sujetos sanos y periodontitis agresiva localizada, sin embargo las únicas bandas identificables se encontraron entre 55 y 70 kD. La MMP-14 se diferencia de las MMPs solubles por presentar un dominio transmembrana y una cola intracitoplasmática y pertenece por esta razón a la familia de las MMPs de membrana (MT-MMPs)⁽⁹⁾. Además de presentar actividad colagenolítica, la MMP-14 puede actuar como un potente activador de otras MMPs que incluyen -8, -13 y -2^(8,10,11). Mientras que la MMP-8 corresponde a la MMP más prominentemente expresada en la periodontitis crónica^(6,18,25-28), la MMP-13 recientemente se ha propuesto como un potencial marcador de progresión de la enfermedad^(6,19,20), y ambas corresponden a las colagenasas más importantes involucradas en la patogénesis de la periodontitis crónica. Sin embargo, el significado funcional de la MMP-14 y de sus formas solubles no se conoce hasta la fecha. Existen reportes⁽²⁹⁾ que indican que la MMP-14 unida a membrana es capaz de actuar como una autoconvertasa, induciendo su propia activación mediante proteólisis de su prodominio en el motivo de furina; consecutivamente, la enzima activa es capaz de proseguir su auto proteólisis, generando fragmentos de alrededor de 60 kD e inferiores, similares las formas encontradas en el FCG.

Los complejos pueden corresponder a formas de la MMP-14 unidas a otras MMPs o inhibidores⁽⁶⁾. Por otro lado, existen otros sustratos bioactivos de la MMP-14, que incluyen mediadores de la respuesta inflamatoria y entre estos, CXCL12^(8,30). CXCL12 corresponde a una potente quimioquina, capaz de inducir el reclutamiento de polimorfonucleares neutrofilos y células mononucleares a los sitios de inflamación periodontal⁽¹⁴⁾. CXCL12 se expresa abundantemente en tejido gingival inflamado y endotelio vascular, mientras que los leucocitos inflamatorios expresan en altas cantidades su receptor CXCR4; se ha visto que los niveles de CXCL12 en el FCG son significativamente mayores en sujetos con periodontitis crónica en relación con controles⁽¹⁴⁾. Adicionalmente se ha visto que la unión de CXCL12 a su receptor CXCR4 en células mononucleares es fundamental durante la reabsorción ósea, estimulando la quimiotaxis de los precursores de los osteoclastos a los sitios de osteólisis, fusión de estos y expresión de TRAP⁽¹³⁾. CXCL12 induce también el aumento de la expresión de las MMPs del tejido óseo, incluyendo las MMPs -13 y -14 durante la migración e invasión celular en cáncer prostático⁽³¹⁾. En este estudio, identificamos la expresión de CXCL12 en el FCG de sujetos con periodontitis progresiva y caracterizamos por primera vez las inmunoreactividades de CXCL12 en el FCG. CXCL12 es una quimioquina que en su forma monomérica presenta una masa de aproximadamente 8-8,5 kDa⁽³⁰⁾. Las inmunoreactividades identificadas en el FCG son similares a aquellas descritas previamente en suero⁽²⁴⁾, y podrían corresponder a las diferentes isoformas alfa y beta de CXCL12, como también a complejos homo y/o heterotípicos. De este modo, CXCL12 en el FCG de sujetos con periodontitis crónica progresiva se encuentra fundamentalmente formando complejos que podrían corresponder a MMP-14/CXCL12, en base a la similitud de masas de los complejos identificados tanto para MMP-14 como CXCL12 y a la correlación positiva que se evidenció en sitios activos, que sugiere la presencia de interacciones entre ambas proteínas.

Si bien, tanto CXCL12 como MMP-14 se encuentran presentes en periodontitis crónica progresiva, sus niveles no variaron entre sitios activos e inactivos, excepto por una leve tendencia de la MMP-14 a aumentar en los primeros. Sin embargo, en sitios activos de sujetos con progresión encontramos que la expresión de MMP-14 aumentó conjuntamente con los niveles de CXCL12 en el FCG. La actividad de CXCL12 se encuentra regulada no sólo a nivel de la expresión de la quimioquina, sino que también por la expresión de su receptor CXCR4 y proteólisis enzimática, entre otros mecanismos⁽³⁰⁾. Estudios previos han demostrado que CXCL12 es un sustrato bioactivo de la MMP-14 *in vitro* modificando su actividad biológica a través de proteólisis⁽³⁰⁾, mientras que *in vivo*

esta asociación podría resultar en cambios funcionales de la actividad quimiotáctica de CXCL12 a nivel de sitios activos contribuyendo a la destrucción de los tejidos de soporte periodontal. Niveles elevados de CXCL12 pueden inducir aumentos de la expresión e incluso activación de MMP-14, y a su vez MMP-14 inactiva a CXCL12, representando un mecanismo de interacción/regulación entre MMPs y quimioquinas y por tanto en la respuesta inmune durante la fase activa de la periodontitis crónica. La inducción de MMPs -2, -9, -13 y -14 por los osteoblastos y/o osteoclastos es fundamental en el inicio de la reabsorción de matriz ósea durante procesos como la invasión tumoral^(7,11), mientras que el uso de inhibidores de colagenasas y gelatinasas es capaz de prevenir la reabsorción ósea *in vitro*^(32,33). CXCL12 podría actuar en la diferenciación temprana de osteoclastos, mientras que la MMP-14 podría inactivar a CXCL12 e iniciar la remoción de matriz orgánica del hueso, mediante la activación de las cascadas proteolíticas mediadas por MMP-13 y -2 y/o mediante su actividad colagenolítica directa. El efecto pleiotrópico de esta enzima, podría explicar la presencia de variaciones sutiles de su expresión en sitios activos e inactivos. De este modo, incrementos leves en su actividad podrían representar un evento clave en la progresión

de la periodontitis crónica, mediante la activación de potentes cascadas proteolíticas mediadas por MMP-13 y a través de la modificación de la actividad biológica de mediadores inflamatorios, que se han visto involucradas en la progresión de la periodontitis crónica (en revisión en *J Clin Periodontol* CPE-05-09-2072).

Concluimos que MMP-14 y CXCL12 se expresan en sujetos con periodontitis crónica progresiva y que por tanto podrían estar implicados en la patogenia de la enfermedad. A nivel de sitios activos, MMP-14 aumenta conjuntamente con CXCL12 y esta asociación podría estar relacionada con la pérdida activa de soporte periodontal. Sin embargo, el rol de la MMP-14 y CXCL12 en las enfermedades periodontales ha sido pobremente estudiado y por tanto requiere el desarrollo de nuevos estudios para esclarecer su función en las enfermedades periodontales, así como también, del significado funcional de la asociación entre estos mediadores en la enfermedad. El desarrollo de nuevos estudios, podría abrir la posibilidad de nuevas estrategias de tratamiento periodontal, que podrían incluir el uso de inhibidores sintéticos de MMPs, donde la MMP-14 podría representar un nuevo blanco de interés⁽¹⁵⁾.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dahan M, Nawrocki B, Elkaim R, et al. Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva. *J Clin Periodontol*. 2001 Feb;28(2):128-36.
- Goodson JM, Haffajee AD, Socransky SS. The relationship between attachment level loss and alveolar bone loss. *J Clin Periodontol*. 1984 May;11(5):348-59.
- Jepsen S, Springer IN, Buschmann A, Hedderich J, Acil Y. Elevated levels of collagen crosslink residues in gingival tissues and crevicular fluid of teeth with periodontal disease. *Eur J Oral Sci*. 2003 Jun;111(3):198-202.
- Ashley RA. Clinical trials of a matrix metalloproteinase inhibitor in human periodontal disease. SDD Clinical Research Team. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 30;878:335-46.
- Kiili M, Cox SW, Chen HY, 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*. 2002 Mar;29(3):224-32.
- Tervahartala T, Pirila E, Ceponis A, et al. The *in vivo* expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res*. 2000 Dec;79(12):1969-77.
- Ohshiba T, Miyaura C, Inada M, Ito A. Role of RANKL-induced osteoclast formation and MMP-dependent matrix degradation in bone destruction by breast cancer metastasis. *Br J Cancer*. 2003 Apr 22;88(8):1318-26.
- Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol*. 2002 Sep;22(1):51-86.
- Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol*. 2004;48(5-6):411-24.
- Holopainen JM, Moilanen JA, Sorsa T, et al. Activation of matrix metalloproteinase-8 by membrane type 1-MMP and their expression in human tears after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Jun;44(6):2550-6.
- Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, et al. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase A (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem*. 1996 Jul 19;271(29):17124-31.
- Maisi P, Prikk K, Sepper R, et al. Soluble membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and gelatinase A (MMP-2) in induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid of human bronchial asthma and bronchiectasis. *APMIS*. 2002 Nov;110(11):771-82.
- Wright LM, Maloney W, Yu X, Kindle L, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone*. 2005 May;36(5):840-53.
- Havens AM, Chiu E, Taba M, et al. Stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) levels increase in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008 May;79(5):845-53.
- Lee HM, Golub LM, Cao J, et al. CMT-3, a non-antimicrobial tetracycline (TC), inhibits MT1-MMP activity: relevance to cancer. *Curr Med Chem*. 2001 Feb;8(3):257-60.
- Mantyla P, Stenman M, Kinane D, et al. Monitoring periodontal disease status in smokers and nonsmokers using a gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8-specific chairside test. *J Periodontol Res*. 2006 Dec;41(6):503-12.
- Mantyla P, Stenman M, Kinane DF, et al. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J Periodontol Res*. 2003 Aug;38(4):436-9.
- Sorsa T, Mantyla P, Ronka H, et al. Scientific basis of a matrix metalloproteinase-8 specific chair-side test for monitoring periodontal and peri-implant health and disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 30;878:130-40.
- Hernandez M, Martinez B, Tejerina JM, Valenzuela MA, Gamonal J. MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2007 Sep;34(9):729-35.
- Hernández M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, et al. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol*. 2006 Nov;77(11):1863-70.
- Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J Clin Periodontol*. 1983 May;10(3):298-310.
- Sorsa T, Tjaderhane L, Kontinen YT, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med*. 2006;38(5):306-21.
- Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*. 1993 May;64(5 Suppl):474-84.
- Villalba S, Salvucci O, Aoki Y, et al. Serum inactivation contributes to the failure of stromal-derived factor-1 to block HIV-1 infection *in vivo*. *J Leukoc Biol*. 2003 Nov;74(5):880-8.
- Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis*. 2004 Nov;10(6):311-8.
- Ingman T, Sorsa T, Michaelis J, Kontinen YT. Matrix metalloproteinases-1, -3, and -8 in adult periodontitis *in situ*. An immunohistochemical study. *Ann N Y Acad Sci*. 1994 Sep 6;732:459-61.
- Golub LM, Sorsa T, Lee HM, et al. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol*. 1995 Feb;22(2):100-9.
- Ingman T, Tervahartala T, Ding Y, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1996 Dec;23(12):1127-32.
- Rozañov DV, Strongin AY. Membrane type-1 matrix metalloproteinase functions as a proprotein self-convertase. Expression of the latent zymogen in *Pichia pastoris*, autolytic activation, and the peptide sequence of the cleavage forms. *J Biol Chem*. 2003 Mar 7;278(10):8257-60.
- McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, et al. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXCL chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem*. 2001 Nov 23;276(47):43503-8.
- Singh S, Singh UP, Grizzle WE, Lillard JW, Jr. CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. *Lab Invest*. 2004 Dec;84(12):1666-76.
- Hill PA, Docherty AJ, Bottomley KM, et al. Inhibition of bone resorption *in vitro* by selective inhibitors of gelatinase and collagenase. *Biochem J*. 1995 May 15;308 (Pt 1):167-75.
- Hill PA, Murphy G, Docherty AJ, et al. The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. *J Cell Sci*. 1994 Nov;107 (Pt 11):3055-64.

CORRESPONDENCIA AUTOR

Marcela Hernández.
mhernandezrios@gmail.com

Trabajo recibido el 09/06/2009.
Aprobado para su publicación el 05/08/2009.