

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**



**Facultad de Medicina y Odontología**

Departamento de Estomatología. Unidad Docente de Médico-Quirúrgica

**Búsqueda de miARNs en fluido crevicular gingival: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada**

3143- PROGRAMA DE DOCTORADO EN ODONTOLOGÍA

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**Pedro José Almiñana Pastor**

Dirigida por:

**Prof. Dr. José Luis García Giménez**

**Prof. Dr. Andrés López Roldán**

**Prof. Dr. José Vicente Bagán Sebastián**

Tutor:

**Prof. Dr. Francisco Alpiste Illueca**

Valencia, Octubre 2020



UNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA



VNIVERSITAT (Q̄) Facultat de Medicina i Odontologia  
ID VALÈNCIA

Prof. Dr. D. José Luis García Gimenez, profesor asociado del Departamento de Fisiología de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València, Don Andrés López Roldán, profesor asociado del Departamento de Estomatología de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València, D. José Vicente Bagán Sebastián, catedrático del Departamento de Estomatología de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València y D. Francisco Alpiste Illueca, profesor contratado doctor del Departamento de Estomatología de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València.

CERTIFICAN QUE:

La presente Tesis Doctoral que lleva por título **“Búsqueda de miARNs en fluido crevicular gingival: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada”**, ha sido realizada bajo nuestra dirección y supervisión por D. Pedro José Almiñana Pastor, graduado en Odontología por la Universitat de València.

Revisado el presente trabajo quedan conformes con su presentación, ya que reúne las condiciones para ser defendido como Tesis Doctoral.

Y para que conste y a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia,  
a 16 de Octubre del 2020 .

D. José Luis García Giménez

D. José Vicente Bagán Sebastián

D. Andrés López Roldán

D. Francisco Alpiste Illueca



## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han participado de una forma u otra en esta tesis doctoral, y quiero empezar agradeciendo la ayuda, el interés y confianza depositada en mi.

En primer lugar, al Dr. Francisco Alpiste, por confiar desde el primer día en mi y dedicar muchas horas de su tiempo en mi formación y en la realización de esta tesis doctoral. Gracias por los consejos en el ámbito profesional y personal que me han hecho crecer y que valoro mucho.

Al Dr Andrés López, que me ha animado durante estos años para la realización de esta tesis y que ha sido una guía en la que apoyarme en la periodoncia y la investigación.

Al Dr Jose Luis García, porque gracias a él he podido entender un poco más del mundo de la epigenética y ha sido una ayuda fundamental.

Al Dr Jose Vicente Bagán, por haberme ayudado y apoyado de forma desinteresada siendo para mi un verdadero honor que forme parte de mi tesis doctoral.

A todo el equipo de epidisease, en especial a Esther y Daymé que con mucha paciencia soportaron mi inexperiencia en el laboratorio y en el análisis bioinformático de los datos. Y un agradecimiento muy especial para la Dra Eva M<sup>a</sup> García, que siempre ha estado dispuesta a responder a mis dudas y ayudarme en todo lo que he necesitado, siempre te agradeceré mucho tu actitud hacia mi y tu tiempo invertido, gracias.

A todos mis profesores y compañeros del máster de periodoncia de la Universitat de València con los que he podido compartir y espero seguir compartiendo estos años de mi vida. Un agradecimiento especial a Lolo y Ana que me ayudaron de forma desinteresada en la obtención de las muestras. Al Dr Gil Loscos que siempre se ha interesado por mi trabajo y ha sido un apoyo que he agradecido mucho durante estos años. A la Dra Regina Izquierdo por apoyarme siempre y confiar en cualquier cosa que emprenda. Y por supuesto, muchas gracias a Iris, Maria, Marta y Pau por ser mis hermanos periodontales.

A Montse Catalá, por confiar y enseñarme tanto de la odontología y la investigación y tener siempre tiempo para mis inquietudes o para despertar mi interés en casos extraordinarios.

A mis amigos Carlos, Ernesto, Javi y Héctor quienes han sido espejo donde desahogar mis frustraciones y siempre me han respondido con apoyo incondicional. Gracias por ser como sois y formar parte de mi vida.

A Montse, por apoyarme en todo lo que hago, por creer en mi, y por darme todo de ella a cambio de nada. Eres mi mayor suerte, gracias.

A mis padres Rafi y Pedro, por todo lo que han hecho por mi, al pensarlo me hago muy pequeño. Os quiero, gracias.

# ÍNDICE





## 1. ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	17
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	23
2.1. Las enfermedades periodontales	23
2.1.1. Enfoque desde la clasificación de 1999. Concepto, clasificación y prevalencia	23
2.1.1.1. Enfermedades gingivales	24
2.1.1.2. Periodontitis crónica	25
2.1.1.3. Periodontitis agresiva	26
2.1.1.4. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas	26
2.1.1.5. Enfermedades periodontales necrotizantes	27
2.1.1.6. Abscesos del periodonto	27
2.1.1.7. Periodontitis asociadas a lesiones endodónticas	27
2.1.1.8. Deformidades y condiciones del desarrollo o adquiridas	28
2.1.2. Enfoque desde la clasificación del 2018	28
2.1.2.1. Estadios de periodontitis	29
2.1.2.2. Grados de periodontitis	29
2.2. Anatomía/estructura anatomo-histológica y fisiológica del periodonto	32
2.2.1. Componentes del periodonto	32
2.2.1.1. Encía	32
2.2.1.2. Ligamento periodontal	34
2.2.1.3. Cemento radicular	36
2.2.1.4. Hueso alveolar	38
2.2.2. Unión dento-gingival	39
2.2.2.1. UDG: epitelio de unión	40
2.2.2.2. UDG: inserción conectiva	42
2.2.2.3. UDG: surco gingival	44
2.2.3. Fluido Crevicular Gingival (FCG)	45
2.2.3.1. Concepto, formación y significado fisiológico del FCG	46
2.2.3.2. Métodos de recolección	48

## Índice

2.2.3.3. Problemas con la toma de muestras de FCG y la interpretación de datos	51
2.2.3.4. Componentes del FCG	51
2.2.3.5. Potencial interés del FCG	53
2.3. Patogenia periodontal	54
2.3.1. El Biofilm	54
2.3.2. Patógenos	57
2.3.3. Biología molecular de la respuesta inmuno-inflamatoria	58
2.3.4. Estadios histológicos y clínicos	60
2.3.5. Mediadores inflamatorios del hospedador	61
2.3.6. Moléculas relacionadas con la fase resolutive de la inflamación	63
2.4. Genética	65
2.4.1. Conceptos claves y relación con las enfermedades periodontales	65
2.4.2. Transmisión de la información genética	66
2.4.3. Genética y periodontitis	71
2.5. Epigenética	73
2.5.1. Concepto y mecanismos epigenéticos	73
2.5.1.1. Metilación de ADN	75
2.5.1.2. Modificación post-traducciona l de las histonas	76
2.5.1.3. ARNs no codificantes	76
2.5.2. Biomarcadores epigenéticos	78
2.5.3. Revisión sistemática: epigenética y periodoncia	79
2.5.3.1. Pregunta de revisión	80
2.5.3.2. Criterios de inclusión y exclusión	81
2.5.3.3. Fuentes de información	81
2.5.3.4. Estrategia de búsqueda	81
2.5.3.5. Proceso de selección de estudios	82
2.5.3.6. Proceso de extracción de datos y lista de variables	82
2.5.3.7. Medición de la calidad de los estudios	83
2.5.3.8. Resultados de la revisión sistemática	83
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>101</b>
<b>4. OBJETIVO</b>	<b>107</b>
4.1. Objetivo general	107

4.2. Objetivos específicos	107
<b>5. METODOLOGÍA</b>	111
5.1. Diseño del estudio	111
5.2. Comité de ética	111
5.3. Selección de la muestra	111
5.3.1. Criterios de inclusión	112
5.3.2. Criterios de exclusión	113
5.3.3. Criterios de retirada durante el estudio	113
5.4. Secuencia de desarrollo del estudio	113
5.5. Registros clínicos	114
5.5.1. Datos demográficos del paciente	114
5.5.2. Estudio periodontal completo: periodontograma	114
5.5.3. Exploración radiográfica	114
5.6. Material clínico y de laboratorio empleado para el estudio	115
5.7. Calibración del Periotron 8000	115
5.7.1. Procedimiento para la calibración	117
5.7.2. Posibles errores en la lectura de la muestra en el Periotron 8000	117
5.8. Procedimiento de toma de muestra de FCG	118
5.8.1. Selección del punto de recogida	118
5.8.2. Procedimiento para la toma de muestra de FCG	118
5.9. Procedimientos y registros de laboratorio	119
5.9.1. Extracción del material biológico del Periopaper y purificación del ARN total de la muestra de FCG	119
5.9.2. Análisis de miARNs	121
5.9.3. Generación de librerías y secuenciación masiva (análisis de los miARNs por tecnología Next Generation Sequencing-NGS)	121
5.9.3.1. Generación de librerías	121
5.9.3.2. Estudio bioinformático de la expresión de miARNs obtenidos por secuenciación masiva NGS	123
5.9.3.3. Análisis de sobrerrepresentación ORA y enriquecimiento de rutas biológicas KEGG implicadas en la fisiopatología de la periodontitis	124
5.9.4. Validación de la firma de miARNs de FCG de pacientes periodontales por RT-qPCR mediante la tecnología “stem loop”	124
5.9.4.1. Procedimiento RT-qPCR a tiempo real mediante tecnología “stem loop”	125

5.10. Estudio estadístico	128
5.10.1. Estudio estadístico de validación de miARNs como biomarcadores	128
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>131</b>
6.1. Descripción de la muestra	131
6.1.1. Homogeneidad de grupos	131
6.1.2. Comparación entre grupos	132
6.1.3. Comparación de los volúmenes de FCG entre grupos	133
6.2. Resultados al primer objetivo planteado: secuenciar mediante la técnica SmallRNA-seq (Next Generation Sequencing) todos los miARNs presentes en el FCG de sujetos sanos y pacientes con periodontitis crónica avanzada	134
6.2.1. Resultados Nanodrop 2000 y Bioanalyzer Agilent 2100	134
6.2.2. Análisis de calidad de lecturas	138
6.2.3. Eliminación de adaptadores y filtrado de secuencias por tamaño y calidad	139
6.2.4. Mapeo y cuantificación de las lecturas	139
6.3. Resultados respecto al segundo objetivo planteado: estudiar la expresión de los miARNs en pacientes con periodontitis crónica avanzada y sujetos sanos	141
6.3.1. Resultados del análisis de expresión diferencial	142
6.4. Resultados respecto al tercer objetivo: seleccionar una firma de miARNs capaces de definir la periodontitis y que estuvieran relacionados con las vías etiopatogénicas implicadas en el desarrollo de la periodontitis	147
6.4.1. Análisis de sobrerrepresentación (ORA) de las rutas KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) en las que participan los miARNs significativos	147
6.5. Resultados respecto al cuarto objetivo: realizar una validación de los miARNs seleccionados	151
6.5.1. Validación mediante RT-qPCR de miARNs en FCG	151
6.6. Análisis adicional de correlación entre los niveles de FCG y los niveles de expresión de los miARNs validados	155
6.7. Análisis adicional específico para los controles 7 y 11	156
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>161</b>
7.1. Discusión de la metodología utilizada en el estudio y limitaciones del estudio	162
7.1.1. Tipo de estudio	162
7.1.2. Muestra del estudio	162
7.1.3. Homogeneidad de los grupos	164
7.1.4. Toma de FCG	165
7.2. Discusión de los resultados	167

7.2.1. Discusión de los resultados al primer objetivo planteado: secuenciar mediante la técnica Small-RNA-seq (NGS) todos los miARNs presentes en el FCG de sujetos sanos y pacientes con periodontitis crónica avanzada	167
7.2.2. Discusión de los resultados respecto al segundo objetivo planteado: estudiar la expresión de los miARNs en pacientes con periodontitis crónica avanzada y sujetos sanos	168
7.2.2.1. Estudios sobre mecanismos epigenéticos en biopsias gingivales con periodontitis	169
7.2.2.2. Estudios previos de miARNs en FCG	171
7.2.3. Discusión de los resultados al tercer objetivo planteado: seleccionar una firma de miARNs capaces de definir la periodontitis	175
7.2.3.1. Interpretación de los resultados sobre las vías metabólicas implicadas en periodontitis. Estudio funcional de las rutas moleculares KEGG reguladas por los miARNs	175
7.2.3.2. Selección y discusión de los mi ARNs que mejor clasifican a los sujetos periodontales	190
7.2.4. Discusión de los resultados respecto al cuarto objetivo: realizar una validación de los miARNs seleccionados	191
7.2.4.1. miR-146a-5p	192
7.2.4.2. miR-199b-3p	193
7.3. Novedades que aporta esta tesis doctoral, limitaciones y propuesta de nuevas hipótesis y líneas de investigación	195
<b>8. CONCLUSIONES</b>	205
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	209
<b>10. ANEXOS</b>	241
10.1. Anexo 1. Comité de ética	241
10.2. Anexo 2. Consentimiento informado	242
10.3. Anexo 3. Tablas de relación de material clínico y de laboratorio	246
10.4. Anexo 4. Datos de laboratorio	249
<b>11. GLOSARIO DE TÉRMINOS</b>	285



# INTRODUCCIÓN





## 1. RESUMEN

Las enfermedades periodontales son un grupo de patologías en las que se produce alteración y/o pérdida de las estructuras de soporte del diente. Dentro de la patología oral, la gingivitis y la periodontitis junto con la caries dental son las patologías más prevalentes.

La periodontitis es una enfermedad infecciosa multifactorial, en la que se detecta presencia de bacterias en los tejidos, pero éstas por sí solas no son suficientes para iniciar la enfermedad. Está asociada a múltiples factores de riesgo que se relacionan con los hábitos de higiene en el control de la placa dental y el estilo de vida. El estímulo bacteriano, normalmente asociado a un grupo de bacterias gram negativas anaerobias, pone en marcha una señalización molecular que inicia una respuesta inmuno-inflamatoria por parte del hospedador cuyo objetivo es frenar o eliminar las células microbianas. Pero en determinados sujetos, esta respuesta se torna desmesurada y la respuesta encaminada a defender al organismo, paradójicamente produce daño y destrucción de los tejidos de soporte dental.

Podemos pensar que existen múltiples factores que pueden exacerbar o alterar la respuesta a la infección. Son los denominados factores de riesgo, de los que en la periodontitis destacan: el mal control de placa bacteriana, el hábito tabáquico, la diabetes mellitus y el estrés entre otros, que como demuestra la literatura, se relacionan con un mayor riesgo de aparición o de progresión de periodontitis. Se ha visto que estos factores inducen de alguna forma, cambios a nivel molecular que llevan a instaurar un proceso de inflamación crónica que puede acabar produciendo la destrucción tisular.

Cuando se habla de susceptibilidad a una enfermedad es inevitable hablar del componente genético. Mutaciones en ciertos genes, o alteraciones en la expresión de algunos genes que codifican para proteínas proinflamatorias, pueden suponer un genotipo hipersecretor de estas moléculas inflamatorias que podría estar relacionado con un mayor riesgo de presentar periodontitis. En este contexto, son muchas las investigaciones que han intentado encontrar alguna variante genética que se relacionase claramente con un mayor riesgo de progresión de periodontitis. A pesar de que algunos autores encuentran relación entre la presencia de algún gen hipersecretor y la presencia de periodontitis severa, los meta-análisis más recientes fallan al intentar presentar resultados concluyentes

sobre la existencia de una variante genética claramente asociada con la aparición de periodontitis. En otras palabras, se ha visto que existe relación de algunas alteraciones genéticas con la periodontitis, pero también se ha visto que, presentando estas variaciones genéticas, hay individuos que no desarrollan periodontitis y de igual forma, hay individuos con periodontitis que no presentan estas alteraciones genéticas.

Por tanto, después de décadas de investigación en periodoncia todavía hoy en día no está claro el por qué algunos individuos no responden adecuadamente al tratamiento periodontal, o por qué en ciertos sujetos la progresión de la periodontitis es más agresiva.

La epigenética es la ciencia que estudia los factores que condicionan cambios en la expresión genética que se producen sin alterar la secuencia de ADN. Es decir, no se trata de mutaciones en los genes sino de factores (marcadores epigenéticos) que regulan la expresión de determinados genes, que permiten adaptar las funciones de las células a las distintas demandas que puedan requerir debido al cambio en el entorno. Dicho de otro modo, distintas situaciones que ocurren en el entorno celular, como la inflamación, cambios medioambientales etc., ocasionarán modificaciones a nivel epigenético que llevarán al silenciamiento o sobreexpresión de determinados genes relacionados con la síntesis de distintas moléculas. Este nuevo campo de la biología permite analizar de forma dinámica distintas variaciones en la expresión de los genes, aportando una gran ventaja con respecto a la medición estática que proporcionan los marcadores genéticos.

Así pues, se abre una nueva vía de investigación para analizar el potencial de estos marcadores epigenéticos en el diagnóstico, pronóstico, monitorización de respuesta al tratamiento e incluso como agentes terapéuticos. Se ha visto que en determinados cánceres, artritis reumatoide, estados sépticos, enfermedades infecciosas y en estados inflamatorios crónicos entre otros; algunos de estos marcadores epigenéticos entre los que se encuentran los miARNs, se encuentran significativamente desregulados al compararlos con individuos sanos. Estos conocimientos han hecho que se inicien algunas investigaciones que intentan relacionar la periodontitis con la alteración a nivel de estos mecanismos epigenéticos.

Existen pocos estudios en la literatura publicada en el ámbito de la periodoncia que analicen la influencia de los marcadores epigenéticos sobre las enfermedades periodontales. Tampoco existían publicadas revisiones sistemáticas o meta-análisis que analizaran esta asociación.

Esta tesis doctoral se desarrolló con la intención de ser el primer trabajo en realizar un *screening/high-throughput* o búsqueda masiva de miARNs en fluido crevicular gingival

Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada (FCG). Primero nos planteamos la posibilidad de que aparecieran estos biomarcadores epigenéticos en el FCG, y tras realizar un estudio piloto que permitió corroborar la presencia de miARNs en FCG, se desarrolló el protocolo para esta investigación. A partir de la búsqueda se pretendía seleccionar aquellos miARNs que se expresaran diferencialmente en el grupo de enfermos de periodontitis para elegir los más representativos y ver si sería posible validar los resultados con otras muestras independientes.

Esta tesis doctoral puede sentar las bases para establecer una metodología de análisis del fluido crevicular para el diagnóstico de la periodontitis y además contribuir al inicio de una línea de investigación en periodoncia que puede aportar nuevos datos en el estudio de las relaciones sistémicas con la periodontitis, las influencias externas y en definitiva a la patogénesis periodontal.



# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este apartado se va a contextualizar el tema de esta tesis doctoral, por lo que se comentarán aspectos referentes a la definición, clasificación y prevalencia de las enfermedades periodontales. También se detallarán brevemente los distintos constituyentes que forman parte de la anatomía del periodonto, haciendo especial referencia a la unión dento-gingival y al fluido crevicular gingival. Se continuará con aspectos ultraestructurales y de la biología molecular de la respuesta inmuno-inflamatoria del hospedador frente al desafío bacteriano. Finalmente se concluirá con una revisión de los conceptos generales de genética y epigenética, y una revisión sistemática de los estudios que analizan los marcadores epigenéticos en pacientes con patología periodontal.

### 2.1. Las enfermedades periodontales

#### 2.1.1. Enfoque desde la clasificación de 1999. Concepto, clasificación y prevalencia

El conocimiento sobre la etiología, patogenia, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades periodontales se encuentra en continuo proceso de revisión. La información que aportan los nuevos métodos de estudio en el campo de la biología molecular, la genética y epigenética aportan nueva luz a interrogantes que no se sabían responder.

Recientemente, la Academia Americana de Periodoncia (AAP) y la Federación Europea de Periodoncia (EFP) en el workshop mundial sobre la clasificación de las enfermedades y condiciones periodontales y peri-implantarias han propuesto una nueva clasificación para las enfermedades periodontales (Berglundh y cols., 2018; Jepsen y cols., 2018; Papapanou y cols., 2018; Tonetti y cols., 2018; Caton y cols., 2018; Trombelli y cols., 2018; Chapple y cols., 2018). Sin embargo, en el momento en el que se desarrolló esta tesis doctoral, aún estaba vigente la clasificación de Armitage aceptada por la American Academy of Periodontology (AAP) en 1999. Por ello se utilizó la clasificación antigua para clasificar a los sujetos del estudio. A continuación, se desglosan brevemente las características de ambas clasificaciones.

Las enfermedades periodontales son patologías de origen infeccioso que producen afectación o pérdida de los tejidos de inserción y soporte de los dientes. Pueden afectar al epitelio, al tejido conectivo de la encía, al ligamento periodontal y al hueso alveolar. Se asume que, el punto en el que se produce la pérdida de inserción del tejido conectivo es el punto en que se pasa de un estado patológico reversible (gingivitis) a un estado patológico irreversible (periodontitis), con pérdida de soporte óseo resultando en una pérdida de inserción clínica (Williams, 1990). Por tanto, se distinguen dos grandes entidades dentro de la patología periodontal, la gingivitis en la que sólo se produce afectación de la encía sin pérdida de inserción, y la periodontitis. Se define a la periodontitis como una enfermedad infecciosa-inflamatoria asociada a un grupo de microorganismos de la placa bacteriana, que ocasiona pérdida de inserción clínica del diente por destrucción del ligamento periodontal y hueso alveolar. Clínicamente se puede observar presencia de bolsas periodontales y/o recesión gingival. Normalmente las dos entidades (gingivitis y periodontitis) pueden presentarse conjuntamente.

La clasificación de las alteraciones periodontales propuesta por Armitage en 1999 en su artículo titulado *“Desarrollo de un Sistema de Clasificación para las condiciones y enfermedades periodontales”*, (Armitage, 1999), propone 8 grupos: (1) Enfermedades gingivales, (2) Periodontitis Crónica, (3) Periodontitis agresiva, (4) Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas, (5) Enfermedades periodontales necrotizantes, (6) Abscesos del periodonto, (7) Periodontitis asociadas con lesiones endodónticas, (8) Deformidades y condiciones adquiridas o de desarrollo.

A continuación, se resumen las principales características de cada uno de estos grupos:

### **2.1.1.1. Enfermedades gingivales**

Las enfermedades gingivales se caracterizan por la presencia de inflamación localizada únicamente a nivel gingival, sin existir pérdida de tejidos de soporte. Se pueden encontrar diversas entidades a nivel gingival. De éstas la que más destaca por su prevalencia es la gingivitis asociada a placa bacteriana. En este caso, es el desafío bacteriano el que impulsa una reacción inmuno-inflamatoria que lleva al aumento de la permeabilidad capilar, liberación de citocinas y otras moléculas inflamatorias que ocasionarán los signos clínicos característicos de las gingivitis: inflamación (calor, rubor, edema) y sangrado (al sondaje y/o espontáneo). En función del grado de inflamación puede



Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada ser tipificada de leve a severa. Estas gingivitis pueden aparecer junto a una periodontitis, es decir, puede existir pérdida de soporte y presentar conjuntamente inflamación gingival, de igual forma que un paciente ya tratado de periodontitis, en determinados momentos puede presentar episodios de gingivitis sin ser este suceso indicativo de progresión de pérdida de soporte (Flemmig, 1999; Pihlstrom y cols., 2005).

Otros tipos de enfermedades gingivales que se engloban dentro de este primer grupo son: enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos (cambios hormonales, fallos en la función celular inmunitaria), modificadas por medicamentos (fármacos que inducen agrandamiento gingival como *fenitoína*, *ciclosporina* y *nifedipino*) y modificadas por la malnutrición (*hipovitaminosis tipo C* o *escorbuto*).

Se distingue un segundo gran bloque en este primer apartado de la clasificación que son las gingivitis no asociadas a placa. Se trata de raras manifestaciones bucales de enfermedades a nivel sistémico, dentro de las que encontramos: enfermedades gingivales de origen bacteriano, viral, fúngico, genético (como la *fibromatosis gingival hereditaria*), manifestaciones gingivales de enfermedades sistémicas (como *liquen plano*, *pénfigo*, etc...), lesiones traumáticas, reacciones a cuerpo extraño y otras manifestaciones no específicas (Armitage, 1999).

#### **2.1.1.2. Periodontitis Crónica**

Es la forma más prevalente de periodontitis en adultos (Bergström, 2004). La progresión de la pérdida de soporte se produce a lo largo de un periodo de tiempo largo, es decir, progresa de forma moderada o lenta. Normalmente se encuentra asociada a un alto componente etiológico, placa dental y cálculo supra y subgingival abundante, que justificarán la pérdida de soporte. Suele existir un patrón microbiológico variable normalmente asociado a bacterias gram negativas anaerobias. A pesar de su progresión lenta, la concomitancia de factores locales junto con factores sistémicos o ambientales pueden producir “brotos” de actividad puntual que aceleran su progresión. Algunos de estos factores son la Diabetes Mellitus, el hábito tabáquico y el estrés. Estos factores pueden producir una desregulación en el equilibrio homeostático inmuno-inflamatorio y acelerar la pérdida de inserción (Genco y cols., 2005; Bergström, 2004; Pihlstrom y cols., 2005).

La periodontitis crónica puede presentarse de forma localizada afectando a menos del 30% de las localizaciones o de manera generalizada afectando a más del 30%.

Además, según el grado de severidad hablaremos de periodontitis crónica leve (1-2mm de pérdida de inserción clínica (PIC)), moderada (3-4mm de PIC) o severa/avanzada ( $\geq 5$ mm PIC) (Flemmig, 1999).

### **2.1.1.3. Periodontitis Agresiva**

Algunas características que definen y diferencian a la periodontitis agresiva de la crónica son: la rápida progresión de la enfermedad en el tiempo, la ausencia o poca presencia de componente etiológico, los antecedentes familiares que sugieren un rasgo genético, la presencia de ciertos patógenos periodontales asociados a esta forma agresiva como el *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* (AA), y alteraciones en la función de macrófagos con hiperreactividad en síntesis de Prostaglandina E2 (PGE2) e Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).

Aunque mucho menos prevalente que la crónica, las características citadas le aportan una gran importancia, destacando la necesidad de un diagnóstico, tratamiento y control de la enfermedad temprano.

También puede presentarse de forma localizada, con afectación en el primer molar o incisivos con pérdida de inserción en al menos dos dientes permanentes de los cuales al menos uno debe ser un molar; o en su forma generalizada, apareciendo en adultos jóvenes con pérdida de inserción en al menos tres dientes que no sean ni primeros molares ni incisivos. La evolución más frecuente de esta patología cursa con una naturaleza episódica de destrucción periodontal (Armitage, 1999).

### **2.1.1.4. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas**

Algunas alteraciones en los mecanismos de defensa inmuno-inflamatorios del hospedador, como la neutropenia, deficiencia de adherencia de los leucocitos, etc., están presentes en alteraciones hematológicas y genéticas que se han relacionado con la aparición de periodontitis. Estos aspectos hacen que en ocasiones se produzca una rápida progresión de la destrucción periodontal y pueda superponerse con una periodontitis agresiva.

Según la clasificación, cuando existe una alteración sistémica junto con patología periodontal, pero sin una causa o componente etiológico a nivel local que sea consistente con la destrucción periodontal, se debe clasificar bajo este término. Algunos ejemplos de estas enfermedades sistémicas son: neutropenia adquirida, leucemia, síndrome de

Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada Papillon-Lefèvre, síndrome de Chédiak-Higashi, síndrome de histiocitosis, síndrome de Ehler Danlos, síndrome de deficiencia de adhesión de leucocitos etc. (Armitage, 1999).

#### **2.1.1.5. Enfermedades periodontales necrotizantes**

La característica que diferencia a este grupo del resto de enfermedades es la aparición de necrosis en los tejidos periodontales. Clínicamente se presenta ulceración y necrosis papilar con presencia de una pseudomembrana o esfacelo blanquecino. Pueden aparecer papilas romas, con cráteres, con sangrado espontáneo y halitosis. En algunos casos además puede aparecer también sintomatología sistémica como fiebre, malestar y linfadenopatías (Novak, 1999). El tabaquismo, el estrés y la inmunosupresión son algunos de los factores citados como predisponentes. Las dos formas de enfermedades necrotizantes son la GUN (Gingivitis úlcero-necrotizante) y la PUN (Periodontitis úlcero-necrotizante). La característica distintiva entre la PUN y GUN es que en la PUN se produce pérdida de inserción clínica y hueso alveolar (Rowland, 1999).

#### **2.1.1.6. Abscesos del periodonto**

Los abscesos son un tipo de patología periodontal definida como una lesión con contenido purulento, que se localiza a nivel marginal en los tejidos periodontales. Normalmente está asociado a bacterias gram negativas, espiroquetas y fusobacterias (Meng, 1999; Socransky y Haffagee, 2002; Herrera y cols., 2014).

#### **2.1.1.7. Periodontitis asociadas a lesiones endodónticas**

La asociación entre las lesiones de origen pulpar y periodontal puede darse de tres formas. La primera es la lesión endodóntica-periodontal, en la que la necrosis de la pulpa drena a través del espacio del ligamento periodontal y puede dar lugar a la pérdida de tejidos periodontales. La segunda forma, es la lesión periodontal-endodóntica en la que la infección periodontal llega a afectar a la pulpa dental a través de conductos accesorios o del foramen apical. Por último, tenemos las lesiones combinadas en la que la patología periapical aparece en un diente con afectación periodontal (Chang y Lin, 1997; Meng, 1999).

### **2.1.1.8. Deformidades y condiciones del desarrollo o adquiridas**

Este último grupo de la clasificación de Armitage, corresponde a todos aquellos factores locales relacionados con un diente, que por sus características predisponen a una mayor acumulación de placa y por tanto a una mayor predisposición a patología periodontal (Blieden, 1999). Ejemplos de estos factores son: factores anatómicos del diente (como surcos de desarrollo, proyecciones de esmalte (Blanchard y cols., 2012), mala alineación dental, puntos de contacto abiertos (Jernberg y cols., 1983), restauraciones o aparatología oral, fracturas y reabsorciones radiculares. También se incluyen en este grupo las lesiones y defectos mucogingivales (falta de encía queratinizada, frenillos aberrantes (Scully y Laskaris, 1998; Prato, 1999) y el trauma oclusal (Hallmon, 1999).

De estos ocho grupos, las enfermedades gingivales y las periodontitis crónicas son las patologías más prevalentes (Albandar y Rams, 2002; Pihlstrom y cols., 2005). Se ha visto que la presencia de patología gingival se encuentra en torno a un 80% de la población. En cambio, el porcentaje de periodontitis crónicas severas es del 11,2% y para las de grado moderado se cifra entre 20-40% según distintos estudios en población europea y española (Pihlstrom y cols., 2005; Petersen y Ogawa, 2012; Kassebaum y cols., 2014; Carasol y cols., 2016). Es evidente que la periodontitis supone un problema de salud bucodental con una alta prevalencia en la población.

La clasificación de Armitage de 1999 solo se basaba en la severidad de la enfermedad, lo que llevaba en muchas ocasiones a dejar fuera importantes aspectos como los factores de riesgo, la complejidad de manejo y necesidad de capacidades necesarias para controlar el caso. Por este motivo, existía y era motivo de debate la dificultad para diferenciar claramente pacientes con periodontitis agresiva frente a periodontitis crónica (Tonetti y cols., 2018).

### **2.1.2. Enfoque desde la clasificación de 2018**

La nueva clasificación, propone tres formas de periodontitis: enfermedades periodontales necrotizantes, periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas y periodontitis (Jepsen y cols., 2018; Caton y cols., 2018). La clasificación del 2018 se basa en un sistema de estadios y grados.

### 2.1.2.1. Estadios de periodontitis

Los estadios buscan definir el caso de periodontitis en función de la severidad y extensión de la enfermedad y permitir valorar el grado de complejidad necesario para poder controlar la enfermedad (Tonetti y cols., 2018). Se definen cuatro estadios de periodontitis:

- **Estadio 1:** primeros estadios de pérdida de inserción. En este momento es donde pueden cobrar especial importancia los biomarcadores ya que las exploraciones clínicas pueden ser insuficientes.
- **Estadio 2:** se corresponde con la periodontitis establecida o moderada.
- **Estadio 3:** existe una periodontitis severa con una pérdida importante de inserción y riesgo de pérdida de dientes debido a la periodontitis, pero aun queda conservada la función masticatoria.
- **Estadio 4:** representa una periodontitis avanzada con alta pérdida de dientes y riesgo potencial de pérdida de toda la dentición. En este estadio ya se ha perdido la función masticatoria (Papapanou y cols., 2018; Tonetti y cols., 2018).

### 2.1.2.2. Grados de periodontitis

En cuanto a los grados de periodontitis, estos buscan predecir el riesgo de futura pérdida de inserción o progresión de periodontitis y estimar el potencial impacto que la periodontitis pueda tener en la salud general o sistémica del individuo (Papapanou y cols., 2018; Tonetti y cols., 2018). La clasificación explica que existen tres grados:

- **Grado A:** hace referencia a una ratio lenta de progresión de la periodontitis.
- **Grado B:** ratio de progresión moderada.
- **Grado C:** rápida ratio de progresión.

En resumen, la nueva clasificación de las enfermedades periodontales propone tres dimensiones para definir un caso de periodontitis:

- Pérdida de nivel clínico de inserción en dos dientes no adyacentes.
- Identificación de la forma de periodontitis: periodontitis necrotizantes, periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas y periodontitis.
- Descripción de la presentación a través de un sistema de estadios y grados (Tonetti y cols., 2018).

**Tabla 1. Cuadro resumen de estadios de periodontitis. (Adaptación artículo Papapanou y cols., 2018).**

Estadio de Periodontitis		Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
<b>Severidad</b>	NCI interdental en la zona de mayor pérdida	1 a 2 mm	3 a 4 mm	≥ 5mm	≥ 5mm
	Pérdida ósea radiográfica	Tercio coronal (<15%)	Tercio coronal (15-30%)	mayor o igual al 50% de la raíz	mayor o igual al 50% de la raíz
	Pérdida de dientes	Sin pérdida de dientes debido a periodontitis		≤ 4 dientes perdidos por periodontitis	≥5 dientes perdidos por periodontitis
<b>Complejidad</b>	Local	Máxima profundidad de sondaje ≤ 4 mm Pérdida ósea horizontal	Máxima profundidad de sondaje ≤ 5 mm Pérdida ósea horizontal	Máxima profundidad de sondaje ≥ 6mm, defectos verticales de ≥3mm, afectaciones de furcación de grados II y III, defectos alveolares moderados	Necesidad de rehabilitación por: disfunción masticatoria, trauma oclusal secundario, defectos alveolares severos, colapso de mordida, < 20 dientes
<b>Extensión y distribución</b>	Añadir a estadio como descriptor	Para cada estadio, describir su extensión como localizada (<30% de dientes afectados) generalizada (>30% de dientes afectados) y patrón incisivo/molar.			

Tabla 2. Cuadro resumen de grados de periodontitis. (Adaptación artículo Papapanou y cols., 2018; Tonetti y cols., 2018).					
Grados de Periodontitis			Grado A: Ratio lento de progresión	Grado B: Ratio moderado de progresión	Grado C: Ratio rápido de progresión
<b>Criterios Primarios</b>	<b>Evidencia directa de progresión</b>	Datos longitudinales (pérdida ósea radiográfica o NCI)	3 a 4 mm	≥ 5mm	≥ 5mm
	<b>Evidencia indirecta de progresión</b>	% pérdida ósea/edad	<0,25	0,25-1.0	>1.0
		Fenotipo del caso	Altos depositos de biofilm con bajo nivel de destrucción	Destrucción acorde con los depositos de biofilm	La destrucción sobrepasa las expectativas en función de los depositos del biofilm. Patrones de pérdida que sugieren un inicio o progresión rápidas.
<b>Modificadores del grado</b>	<b>Factores de riesgo</b>	Tabaco	No fumador	Fumador de <10 cig/día	Fumador de ≥10 cig /día
		Diabetes	Normoglucémico/sin DM	HbA1c <7.0% en pacientes con DM	HbA1c ≥7.0% en pacientes con DM
<b>Riesgo de impacto sistémico de la periodontitis</b>	<b>Carga inflamatoria</b>	Alta sensibilidad CRP (hsCRP)	<1 mg/L	1 a 3 mg/L	>3 mg/L
<b>Biomarcadores</b>	<b>Indicadores de NCI/pérdida ósea</b>	Saliva, fluido crevicular, suero	?	?	?

Esta última tabla es una traducción y adaptación de la tabla presentada en el artículo de Tonetti y cols. (2018). En la última fila puede observarse como no hay suficiente información para valorar a nivel de biomarcadores, el riesgo de progresión de periodontitis.

En el artículo de Trombelli y cols. (2018), se discute sobre el posible uso de biomarcadores para poder definir casos de gingivitis o periodontitis en estadios en los que la clínica puede ser insuficiente. Se apunta además, que en un futuro, los biomarcadores epigenéticos podrían ser muy útiles en la definición de caso de gingivitis basándose en un perfil de susceptibilidad. Aunque todavía hoy por hoy aún no está determinado, resulta

muy interesante estudiar el camino en el que la inflamación puede modular a través de mecanismos epigenéticos la respuesta del hospedador, en cuyo caso, estos biomarcadores podrían ser una herramienta muy útil en el diagnóstico precoz y medición del riesgo de susceptibilidad/progresión de periodontitis.

## **2.2. Anatomía/estructura anatomo-histológica y fisiológica del periodonto**

En el siguiente subapartado se van a subrayar brevemente las características de los diferentes constituyentes del periodonto. Es fácil pensar que con los avances en la biología molecular y la biotecnología, el estudio de los aspectos ultraestructurales e histológicos de los tejidos periodontales puede parecer algo anticuado. Sin embargo, cuando se analizan estos aspectos desde la perspectiva más amplia que da la biología evolutiva, se ve claramente que la estructura persigue un objetivo funcional para la que ha sido formada biológicamente. En el caso de los tejidos periodontales, las funciones son: dar soporte a los dientes, proteger la integridad del medio interno y reparar los posibles daños provocados por el medio externo.

### **2.2.1. Componentes del periodonto**

#### **2.2.1.1. La encía**

En el periodonto sano o en situación de salud, nos encontramos con tres tipos de encía: la encía marginal libre o no adherida que suele representar un milímetro de ancho y se encuentra separada por el surco gingival del segundo tipo de encía, la encía insertada. La encía insertada se encuentra anclada firmemente al cemento más coronal y al periostio subyacente y sus dimensiones vienen acotadas por el comienzo de la encía marginal y la línea mucogingival (Ainamo y Löe, 1966; Cleaton-Jones y cols., 1978). En tercer y último lugar se presenta la encía interdental, caracterizada por ocupar el espacio de la tronera justo por debajo del punto de contacto, de forma que este punto de contacto hará que la encía interdental presente forma piramidal o forma de “col” o “collado” (Figura 1) (Olsson y cols., 1993; Ainamo y cols., 1988).

El epitelio gingival se caracteriza por ser un epitelio escamoso estratificado. Su componente celular principal es el *queratinocito*, aunque también se encuentran *células de Langerhans*, *células de Merkel* y *melanocitos*. El proceso de proliferación y diferenciación

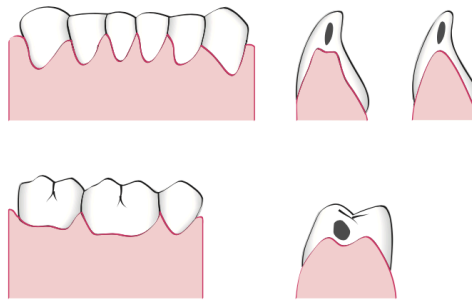


Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada de los queratinocitos hace que en el periodonto aparezcan estructuras epiteliales distintas, con diferentes grados de queratinización (Bartold y cols., 2000).

La función del epitelio gingival es actuar de barrera química y mecánica contra los agentes dañinos del medio externo, incluidos los bacterianos (Dale, 2002). Pero hay que reseñar, que lejos de lo que se creía, el epitelio gingival no solo tiene una función de barrera física, sino que permite el trasiego de información (permeabilidad) desde el exterior, lo que le faculta para el reconocimiento microbiano, señalización y respuesta inmuno-inflamatoria (Bosshardt y Lang, 2005; Dale, 2002). Se ha podido demostrar como las células epiteliales aumentan su proliferación, alteran los eventos de señalización celular y mediante cambios en la diferenciación y la apoptosis, son capaces de adaptarse a la situación para devolver el equilibrio homeostático (Dale, 2002).

Los queratinocitos, se encuentran unidos entre sí, especialmente, gracias a los desmosomas, que presentan placas de anclaje para los tonofilamentos. El espacio existente entre las células epiteliales sirve a su vez de interrelación informativa entre ellas, permitiendo el paso de señales moleculares. Existen distintas capas celulares desde la base hasta la periferia. En la parte más superficial se podrán observar los *cuerpos de Odland*, que son lisosomas modificados que contienen fosfatasa ácida, necesaria para la queratinización. De los demás tipos celulares, se debe destacar el papel de las células de *Langerhans*, que pertenecen al sistema monocito-macrófago y tienen capacidad de procesar antígenos bacterianos; las células de *Merkel*, que albergan terminaciones nerviosas y se les presupone la recepción de la sensación táctil; y los melanocitos que sintetizan melanina (Bartold y cols., 2000; Groeger y Meyle, 2015).

Existen 3 tipos de epitelio gingival: el epitelio bucal, el epitelio del surco y el epitelio de unión. Respecto al epitelio bucal, se trata de un epitelio escamoso estratificado paraqueratinizado (es decir, el estrato córneo conserva núcleos picnóticos). Presenta 4 capas: basal, espinosa, granulosa y córnea. Cubre la superficie externa de la encía, y suele medir de media 0,2-0,3 mm de grosor (Bartold y cols., 2000). El grosor del epitelio y los distintos grados de organización del conectivo subyacente son los que conferirán la diferencia en el color entre la encía y la mucosa alveolar. De modo que la mucosa alveolar será más roja y móvil, y la encía adherida será rosa y con aspecto puntiforme (Cho y Garant, 2000).



**Figura 1.** Imagen que ilustra las variaciones de la encía a nivel interdental en relación con el punto de contacto (Imagen obtenida de Newman y cols., 2014).

### 2.2.1.2. Ligamento periodontal

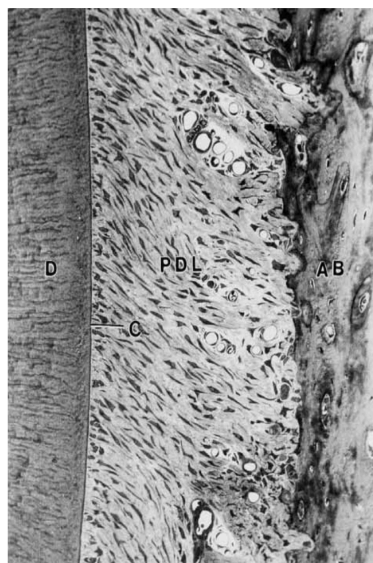
El ligamento periodontal (LP) es un tejido conectivo altamente celular y vascularizado que se encuentra conectando la raíz del diente con el hueso alveolar (McCulloch y Melcher, 1983; Bernick, 1956). Se localiza en el espacio del ligamento periodontal que, aunque con mucha variación, se documenta con una anchura de entre 0,15-0,38 mm (Nanci y Bosshardt, 2006). Además, se sabe que este espacio es dinámico, y que aumentará en un diente sometido a hiperfunción y disminuirá en un diente con hipofunción (McCulloch y cols., 2000; Bercovitz, 1990;).

Las fibras principales del LP se componen en su mayor parte de colágeno tipo I, mientras que las fibras reticulares se componen de colágeno tipo III. Los fibroblastos son las células que sintetizan el tropocolágeno, y estas moléculas de tropocolágeno se van ensamblando en forma de fibras o haces. Pero también nos encontramos fibras elásticas (elastina, oxytalán y elaunina) que normalmente se encuentran asociadas a componentes neurovasculares y se sitúan en paralelo a la raíz (McCulloch y cols., 2000; Nanci y Bosshardt, 2006) (Figura 2).

A nivel celular, se pueden distinguir cuatro tipos de células principalmente:

- **Células del ligamento periodontal:** fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos, cementoclastos, osteoclastos y odontoclastos. Los Fibroblastos también son el componente celular más abundante en el LP, se encargan de la síntesis y degradación del colágeno, manteniendo la homeostasis. Se sitúan a lo largo de las fibras principales (Ten Cate y Deporter, 1975; Roberts y Chamberlain, 1978).

- **Células del epitelio**, del **sistema inmunológico** (neutrófilos, linfocitos, macrófagos, mastocitos y eosinófilos) y células del **sistema neurovascular** (McCulloch y cols., 2000).
- **Restos epiteliales de Malassez**: aparecen en el LP como islas aisladas de células. Están considerados restos de la *vaina epitelial de Hertwig*, que quedan tras el desarrollo radicular (Grant y Bernick, 1969). Se encuentran cercanas al cemento, y aunque su función hoy en día todavía no está del todo clara, parece relacionarse con el proceso de reparación/regeneración del aparato periodontal (McCulloch y cols., 2000; Nanci y Bosshardt, 2006).



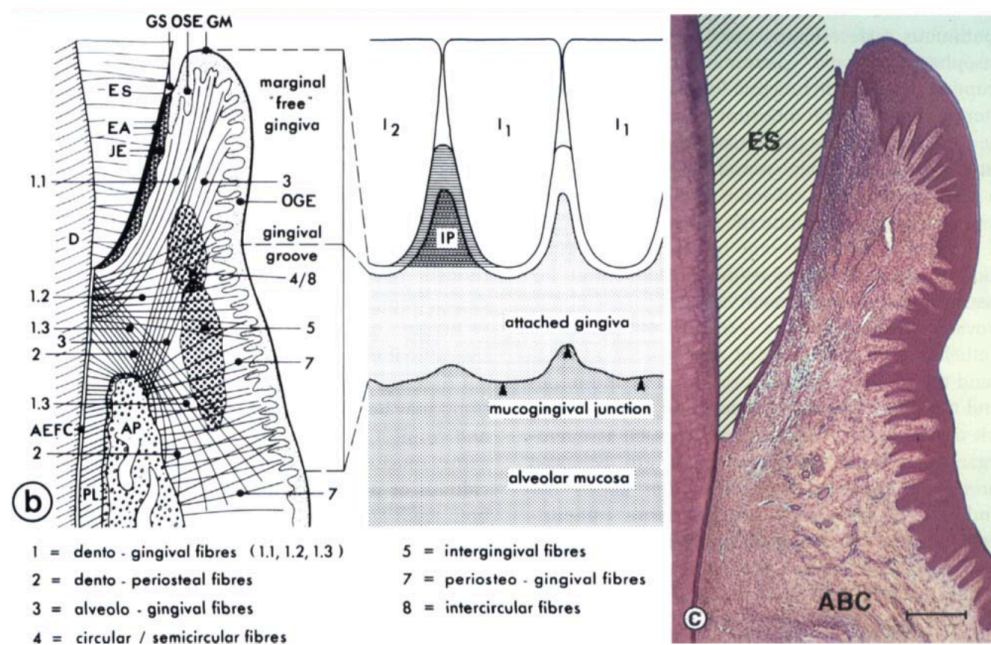
**Figura 2.** Corte histológico que muestra el Ligamento periodontal (LP) en relación con el cemento radicular (C) y el hueso alveolar (AB) (Imagen obtenida del artículo de Bosshardt y Lang, 2005).

La sustancia fundamental presente en el LP se constituye en un 70% de agua, y se piensa que tiene un efecto significativo en la amortiguación de las cargas de estrés masticatorio. Tras una fuerza oclusal, los fluidos amortiguan la carga y junto con las fibras de colágeno participan en la adaptación a la fuerza masticatoria. Cuando se produce inflamación, existe un aumento de la sustancia fundamental (Nanci y Bosshardt, 2006). Los otros componentes son glicosaminglicanos (como el ácido hialurónico) y glicoproteínas como (fibronectina y laminina) (Worapamorn y cols., 2000).

Una de las características funcionales más importantes del LP es la capacidad de adaptación del LP a las demandas funcionales, de modo que ante una sobrecarga el espacio del LP puede ensancharse incluso hasta un 50% más, y en condiciones de hipofunción el LP puede estrecharse (McCulloch y cols., 2000; Nanci y Bosshardt, 2006; Yoshizawa y cols., 2004).

Las fibras principales que unen al cemento radicular y al hueso alveolar se denominan *Fibras de Sharpey*, y se organizan en seis grupos principales: el grupo transeptal que une interproximalmente dos dientes adyacentes; grupo de la cresta alveolar que se dirigen oblicuamente del cemento al hueso; el grupo horizontal que se extiende horizontalmente del cemento al hueso alveolar; grupo oblicuo que se extiende del cemento al hueso en sentido coronal y llevan la carga de la función masticatoria; el grupo apical en la región apical del alveolo; y en sexto lugar el grupo interradicular que se extiende en abanico de cemento a hueso en áreas multirradiculares (Ciancio y cols., 1967).

Además de estas fibras de colágeno principales, se encuentran fibras indiferenciadas o reticulares menos organizadas. Otro aspecto que no se debe obviar es el importante plexo vásculo-nervioso presente en el ligamento periodontal que dota de abundante celularidad, capacidad de adaptación y propiocepción a todo el aparato periodontal (Nanci y Bosshardt, 2006) (Figura 3).



**Figura 3.** Imagen obtenida del artículo de Schroeder y Listgarden (1997), que ilustra a través de un dibujo la disposición de las fibras de colágeno. A la derecha se observa un corte histológico que representa el área dibujada.

### 2.2.1.3. Cemento radicular

El cemento es un tejido conectivo avascular mineralizado que recubre la raíz de los dientes, cuya función más importante es servir de anclaje para las fibras de Sharpey (Foster, 2017). La *vaina epitelial de Hertwig's* que deriva del epitelio del esmalte, envía una

Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada señal a través de la secreción de proteínas de la matriz del esmalte. Estas proteínas inducen en las células ectomesenquimales la diferenciación hacia la estirpe odontoblástica, generando una capa de predentina. Algunas de las células epiteliales quedan aisladas por una membrana basal formando lo que se conoce como los *restos epiteliales de Malassez* que como se ha mencionado quedarán en el espacio del ligamento periodontal maduro. Los cementoblastos en contacto con la dentina depositarán una matriz de cemento. Más tarde, esta matriz se irá mineralizando (Nanci y Bosshardt, 2006).

A nivel bioquímico, el cemento se constituye en un 50% de contenido mineral (apatita) y un 50% material orgánico, siendo el colágeno tipo I el principal componente orgánico del cemento (90%). En menor proporción se pueden encontrar otros tipos de colágeno, sialoproteína ósea, fibronectina, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, factores de crecimiento, etc. (Zhang y cols., 1993; Matias y cols., 2003).

Algunos estudios sugieren que la vaina epitelial de Hertwig es capaz de sintetizar amelogeninas, capaces de inducir la formación de cemento intermedio (Slavkin y cols., 1989). Este hecho, ha motivado el empleo de estas proteínas amelogeninas (Emdogain®) en el tratamiento de la regeneración de los tejidos periodontales, existiendo en la literatura múltiples estudios que apoyan esta hipótesis.

Existen algunos factores moleculares relacionados con la regulación de la cementogénesis como las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y los miembros de la superfamilia factor de crecimiento tumoral- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Estos actúan como un receptor transmembrana para señales epitelio-mesenquimales promoviendo la diferenciación celular de pre-odontoblastos y cementoblastos, lo que ha hecho que la investigación emplee estas moléculas en la regeneración de los tejidos periodontales (Lowenguth y Blieden, 1993; Kadowaki y Yamamoto, 2003). Otras moléculas, son las proteínas de la matriz, como las amelogeninas, sialoproteína ósea, osteopontina y osteocalcina. La fosfatasa alcalina y factores de crecimiento (TGF- $\beta$ , factor de crecimiento derivado de plaquetas, etc.) también se han relacionado con la formación de cemento (Yamamoto y cols., 2004). Por último, el Runx-2 (*runt-related transcription factor-2*) o Cbfa1 (*core binding factor alpha-1*), que son factores de transcripción muy importantes en la diferenciación de los osteoblastos, cementoblastos, cementocitos, odontoblastos y ameloblastos; también son importantes en los procesos de mineralización (Nanci y Bosshardt, 2006).

A nivel histomorfométrico, el espesor del cemento varía del tercio coronal (16-60 micras) al apical (150-200 micras), y además es más grueso en distal que en mesial posiblemente por la migración mesial de los dientes a lo largo de la vida (Dastmalchi y

cols., 1990). El espesor medio del cemento varía con la edad llegando a ser tres veces más grueso en la tercera edad con respecto a los jóvenes (Zander y Hürzeler, 1958). Es importante mencionar también a nivel cervical la unión amelo cementaria (UCA), que puede presentarse en 3 formas: el cemento superpone al esmalte (60% de los casos), unión borde a borde (30%) y exposición de dentina o no contacto esmalte-cemento (5-10%). El último tipo de relación se ha sugerido como punto de *minoris retentia*, y supone un aspecto importante que puede tener implicación a nivel de patología periodontal, de reabsorción radicular y de sensibilidad dentinaria (Neuvald y Consolaro, 2000).

Se puede clasificar en 2 tipos principales. El cemento acelular y el cemento celular. A partir de aquí, se distinguen las siguientes capas (Schroeder y Listgarten, 1997):

- **Cemento acelular afibrilar:** está producido por los cementoblastos y no contiene células ni fibras, solo una sustancia fundamental mineralizada.
- **Cemento acelular de fibras extrínsecas:** producto de cementoblastos y fibroblastos. No presenta células, pero sí fibras de Sharpey densamente condensadas que forman casi la totalidad de esta capa. Se encuentra en el tercio cervical.
- **Cemento celular mixto estratificado:** producido por cementoblastos y fibroblastos. Presenta fibras extrínsecas o de Sharpey e intrínsecas y se localiza en el tercio apical. Puede contener alguna célula.
- **Cemento celular de fibras intrínsecas:** No contiene fibras extrínsecas, pero sí células. Formado por cementoblastos, se puede encontrar en lagunas de reabsorción radicular.
- **Cemento intermedio:** presenta una sustancia fundamental calcificada con restos epiteliales de la *vaina de Hertwig* (Foster, 2017; Harrison y Roda, 1995).

#### 2.2.1.4. Hueso alveolar

El hueso alveolar se define como la parte del hueso maxilar y mandibular que contiene los alveolos dentarios. Se forma con la erupción y desarrollo del diente (Sodek y McKee, 2000).

La anatomía ósea depende del espacio interdental, de modo que en ocasiones si el espacio interdental es estrecho puede ocurrir que sólo exista capa cortical y no esponjosa, hecho que ocurre también en la superficie vestibular de los dientes, sobretudo a un nivel más coronal (Heins y Wieder, 1986).

Se distinguen las corticales óseas, la esponjosa y el hueso que rodea el alveolo o hueso alveolar propio, que cuando sirve de anclaje a las fibras de Sharpey se denomina

Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada *bundle bone* o hueso fasciculado. El hueso cortical presenta una capa laminar sobre los *sistemas de Havers* siendo más fina en el maxilar que en la mandíbula. La trabecular o esponjosa, se dispone también en laminas con *sistemas de Havers* presentes en grandes trabéculas óseas. Entre estas trabéculas se encuentra la médula amarilla, rica en células adiposas, y en ocasiones también se observa médula roja o hematopoyética. El hueso fasciculado se distingue por presentar capas sucesivas de fibras intrínsecas que corren paralelas al alveolo y que se entremezclan con fibras extrínsecas del LP que se insertan perpendicularmente en el propio hueso fasciculado (Sodek y McKee, 2000; Nanci y Bosshardt, 2006).

A nivel celular los osteoblastos se presentan como las células productoras de la matriz orgánica del hueso. Estos osteoblastos provienen de osteocitos, células que extienden sus procesos desde las lagunas a través de los canalículos. Estos canalículos formarán un sistema de aporte de nutrientes y oxígeno a las células (Sodek y McKee, 2000).

Alrededor del 65% de hueso es materia inorgánica (calcio y fosfatos en forma de cristales de hidroxiapatita); y solo una tercera parte es orgánica (colágeno I sobretodo y otras moléculas como citocinas, que pueden tener un papel muy importante en el remodelado óseo) (Sodek y McKee, 2000).

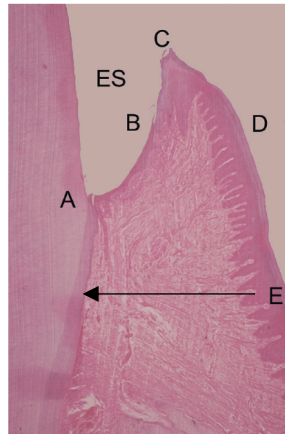
El hueso se encuentra en continuo proceso de remodelación en respuesta a las demandas funcionales. Debe existir una compleja coordinación entre dos líneas celulares, los osteoblastos que formarán hueso y los osteoclastos que lo resorberán. Algunas hormonas (como la PTH o Parathormona) y otras moléculas (como factores de crecimiento, citocinas, vitamina D, etc.) regulan este complicado “acoplamiento” entre osteoblastos que sintetizarán matriz osteoide y los osteoclastos (células multinucleadas gigantes) que resorberán el hueso. Estos osteoclastos se sitúan en las lagunas de Howship creando un microambiente ácido e hidrolítico que desmineralizará la matriz ósea (Vaes, 1988; Blair y cols., 1989).

### **2.2.2. Unión Dento-Gingival (UDG)**

La unión dento-gingival es una unidad funcional descrita por algunos autores como una unidad fisiológica compuesta por el surco, la inserción epitelial y la inserción conectiva (Gargiulo y cols., 1961; Alpiste, 2004). Según distintos estudios de referencia, la inserción epitelial mide de media 0,97mm y la inserción conectiva mide 1,07mm (Gargiulo y cols., 1961). Ambos en condiciones de salud constituyen el espacio biológico, que sería la

distancia desde el fondo del surco gingival a la cresta ósea y mediría alrededor de 2,00 mm de media (Alpiste, 2004).

La UDG se localiza cercana a la LAC (línea amelo-cementaria) y el margen gingival suele cubrir ligeramente la corona anatómica del diente. Los componentes de la unión dento-gingival son los responsables del sellado físico y fisiológico del medio interno y representan la primera barrera de defensa frente al desafío bacteriano (Figura 4).



**Figura 4.** Imagen histológica que ilustra un corte que representa la UDG: A: unión amelo-cementaria, inicio de epitelio de unión; B: Epitelio del surco; C: encía marginal; D: encía adherida; E: inserción conectiva; ES: Surco gingival. (Imagen obtenida de Newman y cols., 2014)

### 2.2.2.1. UDG: Epitelio de unión

Se trata de un epitelio escamoso estratificado no queratinizado. El número de capas celulares se va estrechando de coronal a apical, de modo que pasa de tener de 10-30 capas en la parte más coronal, a 1-2 capas en la parte más apical (figura 5). Deriva del epitelio reducido del esmalte, pero se ha visto que este no es necesario para su formación. Este tipo de epitelio empieza justo donde acaba el fondo del surco gingival (Bartold y cols., 2000; Bosshardt y Lang, 2005). Sus dimensiones son variables entre individuos, pero los estudios de referencia sitúan su longitud en valores en torno a 1 mm. (Gargiulo y cols., 1961; Alpiste, 2004).

Este epitelio se une al diente a través de la lámina basal interna y al tejido conectivo a través de la lámina basal externa. Esta última no difiere de las demás zonas de unión entre epitelios y conectivos. Pero, respecto a la lámina basal interna, las células directamente adheridas al diente se unen gracias a una lámina densa que se adhiere al diente y una lámina lúcida a la que se unen los hemidesmosomas. La literatura, aporta información acerca de la capacidad de estos hemidesmosomas para participar en la

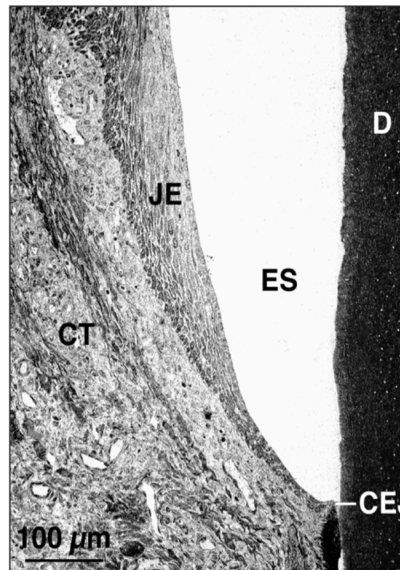


Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada transducción de señales, regulando la expresión génica de diferenciación y proliferación celular (Jones y cols., 1998).

Las células del epitelio de unión difieren de las del epitelio oral. Contienen más citoplasma, retículo endoplásmico y aparato de Golgi, pero presentan menos tonofilamentos y desmosomas, con espacios intercelulares más anchos. Estos espacios contienen leucocitos polimorfonucleares y monocitos que vienen del conectivo y llegan a través del epitelio de unión al surco gingival (Nanci y Bosshardt, 2006).

Los queratinocitos del epitelio de unión presentan un papel activo en el reconocimiento de agentes, regulación de la expresión génica, señalización y defensa inmuno-inflamatoria de los tejidos periodontales (Jones y cols., 1998). Las células mononucleares y las moléculas secretadas por todos los componentes celulares del epitelio de unión, sangre y fluido crevicular; representan la primera línea de defensa frente al ataque microbiano. Algunas de estas moléculas son  $\alpha$ - y  $\beta$ - defensinas, cathelicidinas, Interleucinas (IL-8, IL-1 $\beta$ , y IL-1 $\alpha$ ); factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), y antígeno de función leucocitaria-3. Todas estas moléculas se encargan del complejo mantenimiento del equilibrio homeostático (Nanci y Bosshardt, 2006). Además, algunos autores indican que las células del epitelio de unión podrían tener actividad fagocítica (Cho y Garant, 2000), lo que les dotaría de más capacidad para el mantenimiento del equilibrio huésped-hospedador (figura 5).

Por tanto, son tres las principales características del epitelio de unión: la fuerte inserción del epitelio al diente que se verá reforzada por las fibras gingivales, la capacidad de modificar su permeabilidad permitiendo el paso de células y moléculas al surco gingival, y el alto potencial de renovación celular, que evita la colonización bacteriana a nivel intracelular y permite que ante una disrupción de este collar gingival, el epitelio de unión sea el primero en llegar y vuelva a establecer una situación de sellado (Schroeder y Listgarten, 1997; Schroeder y Listgarten, 2003).



**Figura 5.** Imagen que muestra la relación del epitelio de unión con el diente. JE: epitelio de unión; ES: esmalte; D: diente; CT: tejido conectivo; CEJ: unión cemento adamantina. (Imagen del artículo de Bosshardt y Lang, 2005)

### 2.2.2.2. UDG: Inserción conectiva

La inserción conectiva con sus constituyentes fibrosos y celulares es la principal estructura de anclaje de la encía al diente. Este tipo de tejido presenta una gran cantidad de fibras conectivas, células y vasos sanguíneos que permiten establecer una adecuada homeostasis periodontal. El conectivo presenta células preparadas para la defensa como leucocitos y linfocitos T aún en ausencia de inflamación clínica. Además, presenta un sistema vascular abundante que permite ante un determinado estímulo bacteriano y a través del epitelio de unión, que las células y biomoléculas defensivas puedan llegar al surco gingival a través del fluido crevicular gingival (FCG). El conectivo, envía señales químicas y células que producirán cambios en el epitelio de unión y el epitelio del surco con el objetivo de contrarrestar y/o adaptarse a la situación existente en el surco gingival (Nanci y Bosshardt, 2006).

La rotura de esta inserción supone el paso de un proceso de gingivitis a periodontitis, con pérdida de inserción clínica. Por tanto, el proceso de destrucción periodontal empezará con la pérdida de la capacidad de adherencia del epitelio de unión, que permitirá la instalación bacteriana gram negativa anaerobia y el establecimiento de una respuesta inmuno-inflamatoria que producirá la alteración o desestructuración del tejido conectivo de inserción, que a su vez producirá una situación clínica que favorecerá la instauración de un proceso inflamatorio crónico.

A nivel histológico, el tejido conectivo gingival presenta dos capas: la capa papilar, que se sitúa entre las crestas epiteliales y la capa reticular adyacente al periostio. El principal componente del conectivo es el colágeno, constituyendo alrededor del 60% de su volumen. El componente vásculo-nervioso y la matriz extracelular ocupan un 35% y finalmente el componente celular, principalmente fibroblastos, constituye un 5% del volumen (Bartold y cols., 2000).

A nivel celular, los fibroblastos, de origen mesenquimal, son los responsables del desarrollo, mantenimiento y reparación del tejido conectivo gingival. Su función principal es mantener los componentes de la matriz extracelular, y variarán su fenotipo en función de las demandas, viéndose modificados por diversas señalizaciones moleculares como factores de crecimiento y citocinas. Además, los fibroblastos están implicados en procesos de fagocitosis y degradación de la matriz vía enzimas colagenasas o metaloproteasas de la matriz (MMPs) (Overall, 1994). Estas enzimas junto con los inhibidores tisulares de las metaloproteasas de la matriz (TIMP) se encargan de la regulación de la homeostasis del conectivo. En ocasiones, aparece una desregulación y puede producirse un sobrecrecimiento gingival, o una mayor degradación del conectivo dando lugar a fibromatosis gingivales o a una mayor susceptibilidad a la periodontitis (Ten Cate y Deporter, 1975; Martelli-Junior y cols., 2003). En estos aspectos probablemente tenga mucho que ver la genética o los factores epigenéticos, aunque no hay información suficiente en la literatura.

También se encuentran células inflamatorias como células plasmáticas, linfocitos y macrófagos. Aunque no se sabe con certeza si estas células aparecen en un conectivo clínicamente sano o son reflejo de una inflamación subclínica, es habitual encontrar un cierto infiltrado inflamatorio en el tejido conectivo gingival sano (Bartold y cols., 2000; Hillis y MacLeod, 1996).

### **Composición de la matriz extracelular**

El colágeno es el principal constituyente. Se pueden encontrar fibras de colágeno de tipo I, III, IV y V (Bartold y cols., 2000). Los proteoglicanos, como el dermatán-sulfato, heparán-sulfato, perlecán, etc. también se encuentran en el conectivo gingival. Algunas glicoproteínas de la matriz son la fibronectina, osteonectina, vitronectina y elastina (Bartold y cols., 2000; Embery y cols., 2000). Hay que destacar el papel de las integrinas en la unión de los fibroblastos a estas proteínas de la matriz, sobretodo a la fibronectina presente en

las fibras de colágeno y otros componentes de la matriz. La laminina sirve para la adhesión al epitelio (Ruoslahti y Reed, 1994; Hillis y MacLeod, 1996; Bartold y cols., 2000).

### **Composición neurovascular**

La encía presenta uno de los órganos de aporte sanguíneo más largo del organismo, y como tal, cualquier factor que comprometa el aporte sanguíneo tendrá gran influencia a nivel gingival (Sims y cols., 1988). Adyacente al epitelio de unión nos encontramos con el plexo vascular venoso y en el conectivo encontramos una anastomosis arterio-venosa con estructura glomerular (Sims y cols., 1988).

A nivel neural, se encuentran fibras mielinizadas que además del papel sensitivo, demuestran que ante determinadas señales neuropeptídicas suponen un cambio o contribución neurogénica a la inflamación, motivada por estímulos químicos, mecánicos y probablemente emocionales (Györfi y cols., 1992; Breivik, 1996).

Debido a la alta tasa de renovación tisular, la reparación y cicatrización del conectivo suele ser muy rápida y sin dejar apenas cicatriz. A pesar de su alta tasa de renovación, ésta es inferior a la del epitelio y a la del ligamento periodontal (Melcher, 1976; Bartold y cols., 2000).

#### **2.2.2.3. UDG: Surco gingival**

El surco gingival es el espacio comprendido entre la superficie dentaria y la encía marginal libre. Se podría definir a modo de analogía como el “*hall*” del periodonto. El surco gingival alberga múltiples elementos celulares, entre los que se encuentran las células bacterianas que en este espacio del surco, se presentarán a las células del epitelio del surco y de unión, siendo pues el surco gingival la zona de primer contacto entre el desafío bacteriano y la respuesta inmuno-inflamatoria.

Cuando el diente erupciona y atraviesa la mucosa oral, el epitelio reducido del esmalte (ERE) se une con el epitelio bucal y se convierte en epitelio de unión. Schroeder y Listgarten (1997), explican qué a lo largo de aproximadamente un año, el epitelio de unión va migrando apicalmente a lo largo de la corona sin romper en ningún momento la continuidad. Con la contaminación bacteriana, se crea un espacio virtual que se extiende desde el inicio del epitelio de unión a nivel apical hasta el margen de la encía libre (Cho y Garant, 2000). Es decir, el surco gingival es el espacio existente entre la superficie dental y la encía libre y se encuentra revestido por el epitelio del surco.

El epitelio del surco es escamoso estratificado y no queratinizado (sin capa granulosa ni córnea). Pero lo interesante de este epitelio, es su capacidad de adaptación, es decir, presenta capacidad de queratinizarse (Nanci y Bosshardt, 2006). Por tanto, parece lógico pensar que son los irritantes locales, en este caso en mayor medida los agentes microbianos, los que crean una situación en la que conviene que se cambie la queratinización (Müller-Glauser y Schroeder, 1982).

Otro aspecto importante de este epitelio es su capacidad de actuar como una membrana semi-permeable. Si bien es cierto que no es tan permeable como el epitelio de unión, sí que se ha demostrado que permite el paso del fluido crevicular y también sirve de puerta de entrada para determinados productos bacterianos (Bartold y cols., 2000).

La importancia del surco es indiscutible. Prueba de ello es que uno de los principales signos exploratorios de las enfermedades periodontales, se realiza introduciendo una sonda periodontal en este surco. Es lo que se denomina sondaje periodontal. Solo en condiciones experimentales se puede esperar que el surco mida 0 mm. Es decir, siempre existirá un número mínimo de células bacterianas en el surco que obligará a los constituyentes de la UDG a responder ante este desafío (Caffesse y cols., 1980). En otras palabras, la presencia de bacterias induce la formación del surco, que aparece tras un proceso de adaptación morfológico-biomolecular.

En condiciones de salud gingival, los valores de profundidad de surco varían entre estudios, desde 0,69 a 2,2 mm (Gargiulo y cols., 1961; Alpiste, 2004). En el surco gingival se produce el primer contacto de las bacterias con el sistema inmuno-inflamatorio. El desbalance en la respuesta inflamatoria del hospedador frente a la presencia de bacterias provocará una serie de cambios inflamatorios a nivel molecular y ultraestructural, que producirán un aumento de la producción de fluido crevicular. Todo ello puede ocasionar la desinserción del epitelio de unión, migración apical y destrucción de la inserción conectiva y hueso alveolar, es decir, la pérdida de inserción clínica de los tejidos periodontales. Con esto, la profundidad del surco aumentará considerando patológica una profundidad de sondaje superior a 3 mm.

### **2.2.3. Fluido crevicular gingival (FCG)**

En este apartado se analizan algunas de las características que destacan al fluido crevicular gingival como una “ventana” para el análisis de la condición periodontal.

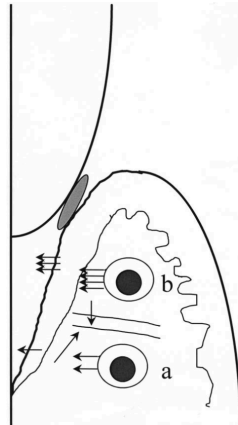
En el organismo, el epitelio de unión es el único epitelio no queratinizado que se enfrenta y es capaz de adherirse a un tejido duro inerte. Esta peculiaridad supone un desafío en el área dento-gingival para proteger el periodonto y la integridad del medio interno de los cientos de especies bacterianas que se encuentran presentes en la cavidad oral. El fluido crevicular gingival tiene un papel especial en el mantenimiento de la estructura del epitelio de unión y en la defensa antimicrobiana del periodonto (Uitto, 2003).

El FCG está formado por una compleja mezcla de sustancias derivadas del suero, leucocitos, células estructurales del periodonto y bacterias orales. Todas estas sustancias presentan características que les permiten presentarse como potenciales indicadores del estado de la patología periodontal (Uitto, 2003).

### **2.2.3.1. Concepto, formación y significado fisiológico del FCG**

A nivel conceptual, el fluido crevicular gingival se define como un transudado seroso o de forma más común como un exudado inflamatorio que se encuentra en el surco/bolsa periodontal, entre el diente y el margen gingival. Contiene componentes derivados del suero plasmático, de células inflamatorias, de los fibroblastos del tejido conectivo, del epitelio y de la microflora. Se pueden encontrar marcadores inflamatorios que incluyen citocinas, enzimas e interleucinas, así como productos derivados de la destrucción tisular del periodonto y de la ecología bacteriana (Pöllänen y cols., 2003; Lamster and Ahlo, 2007).

Para explicar la formación del fluido crevicular gingival se proponen dos modelos. El primero de ellos, propuesto por Alfano en 1974, propone que la presencia de placa bacteriana resultaría en el acumulo de moléculas que penetrarían en el epitelio e inducirían un gradiente osmótico que llevaría el fluido intersticial del conectivo al surco gingival (Alfano, 1974; Griffiths, 2003). Por otro lado, el modelo propuesto por Pashley sugiere que la producción del FCG se dirige por el paso de fluido desde los capilares (filtrado capilar) y que su circulación se produce gracias al sistema linfático (drenaje linfático). De este modo, cuando el filtrado capilar excede el consumo linfático, el fluido se acumula y produce edema y sale del tejido como fluido crevicular gingival (Figura 6) (Pashley, 1976; Griffiths, 2003).



**Figura 6.** Modelo matemático de Pashley. Sección transversal de dos capilares y longitudinal de un vaso linfático con flechas que marcan el paso del fluido (Griffiths, 2003).

- (a) En ausencia de inflamación: baja permeabilidad vascular y de la membrana basal con poco flujo de FCG y alto porcentaje de consumo linfático.
- (b) La placa bacteriana induce un gradiente osmótico, aumentando la permeabilidad vascular y cambios en la membrana basal, resultando en un aumento de paso de fluidos a los tejidos y aumento de la producción de FCG (Griffiths, 2003).

En cuanto al significado, el FCG es un determinante muy importante de la ecología del surco o bolsa periodontal. Al día se producen de 5-24 ml de fluido crevicular. Sus principales funciones son la acción de lavado, que permite la eliminación de las moléculas presentes en el surco gingival; y un efecto de aislamiento, que dificulta la entrada de sustancias, incluso de la saliva, en este espacio periodontal. Por tanto, el FCG condiciona el crecimiento de microorganismos a nivel subgingival y hace que este fluido se presente como un buen marcador de actividad de las enfermedades periodontales (Goodson, 2003).

Los constituyentes del FCG en condiciones de salud participan en el normal mantenimiento de la función de las células directamente adheridas al diente (Cimasoni, 1983; Pöllänen y cols., 2003; Griffiths, 2003). Cuando se produce inflamación, el volumen de fluido crevicular aumenta y su composición proteica es similar a la del suero. Este aumento contribuye a la defensa del hospedador mediante el lavado bacteriano y de sus metabolitos fuera del surco restringiendo su penetración a nivel tisular (Cimasoni, 1983; Pöllänen y cols., 2003; Griffiths, 2003).

Aún en condiciones de salud, existe un infiltrado inflamatorio mínimo en el tejido conectivo (Attström, 1970). En los estadios iniciales de inflamación, la medida cuantitativa del volumen y flujo puede ser más representativo del estado inflamatorio que los signos clínicos; de modo que, sitios diagnosticados clínicamente como sanos, podrían cambiar su grado a inflamación subclínica al cuantificar el FCG (Attström, 1970; Griffiths, 2003).

### 2.2.3.2. Métodos de recolección del FCG

Para la recogida de muestras de FCG se han empleado diferentes técnicas. En este subapartado se exponen las tres estrategias básicas empleadas en la investigación, destacando las ventajas y desventajas de cada una. La elección de una u otra técnica dependerá de los objetivos del estudio del FCG.

#### A. Método de lavado gingival

Se emplea una solución isotónica como la solución de Hank's con un volumen fijo. El fluido que se recolecta es una disolución del FCG y contiene células y constituyentes solubles como proteínas plasmáticas. Se emplean dos métodos: instilación doce veces de diez microlitros de solución de Hank's en la papila interdental; o mediante una técnica más compleja, se puede personalizar unacrílico que permita el aislamiento del medio bucal de la encía y la irrigación durante quince minutos con la solución.

Este método es especialmente útil para el análisis celular, pero las técnicas necesarias para su recolección hacen que sea un método de aplicación limitada y solo presenta utilidad en la obtención de FCG en pocos individuos. Está indicada especialmente en el maxilar, ya que en la parte de la mandíbula el diseño de la aparatología se torna muy dificultosa. Aunque el principal inconveniente de este método es que no se puede recuperar todo el fluido crevicular durante el proceso de aspiración/re-aspiración. Por ello, la cuantificación del volumen o el análisis de su composición no es posible realizarlo de forma precisa (Griffiths, 2003) (Figura 7).



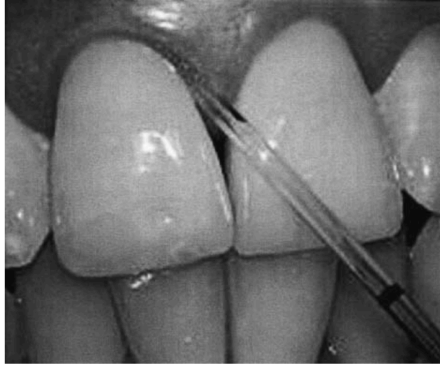
**Figura 7.** Método de lavado gingival para toma de FCG. Se instilan 10 $\mu$ l con una microjeringa y se re-aspira (Griffiths, 2003).

#### B. Tubos de capilaridad o micropipetas

Se aísla la zona de la toma del resto del medio oral, y se introduce en el surco un capilar. El FCG asciende por capilaridad. El volumen de fluido puede determinarse midiendo la distancia de ascenso que ha recorrido en el capilar.



Aunque el fluido que se obtiene es FCG “nativo”, sin diluir, es muy difícil recoger un volumen adecuado en un periodo de tiempo corto. Se deberían de emplear alrededor de treinta minutos en la recolección, lo que conlleva riesgo de traumatizar la estructura del surco y por tanto alterar la composición del FCG. Otro inconveniente a este método es la dificultad para realizar completamente el vaciado del capilar (Griffiths, 2003) (Figura 8).



**Figura 8.** Método por capilaridad para toma de FCG. Se introduce un capilar de diámetro conocido en el surco y el fluido asciende (Griffiths, 2003).

### **C. Bandas absorbentes de papel de filtro.**

Existen múltiples variaciones en la aplicación de este método, sobretodo relacionadas con el modo y tiempo de recolección. Las principales ventajas de este método son que es fácil de emplear, rápido, y poco invasivo o traumático si se emplea correctamente (Griffiths, 2003).

Existen dos métodos para la colocación de las “tiras de papel”: Intracrevicular y extracrevicular. El método intracrevicular es el más frecuentemente empleado, se introduce la tira de papel en la entrada del surco, o hasta notar una leve resistencia. En el extracrevicular la tira de papel se queda a nivel del margen gingival sin introducirse en el surco (Löe y Holm-Pedersen, 1965).

Para estimar el volumen de la muestra de la tira de papel existen tres métodos (Griffiths, 2003):

- **Medida lineal:** la cantidad de FCG se mide en función de la distancia que el fluido migra a través del papel.
- **Técnica de tinción:** se emplea fluoresceína o ninhydrina para que el área humectada cambie de color y se pueda medir de forma más precisa la cantidad de volumen de fluido. Pero sus desventajas son que requiere mucho más tiempo de toma y que imposibilita el posterior análisis en el laboratorio, limitando la técnica únicamente para determinar volumen y no para el estudio de sus componentes.

- **Medida mediante el dispositivo electrónico Periotron®:** permite una medición precisa del volumen de FCG y el posterior análisis de la composición de la muestra en el laboratorio. El Periotron® mide el paso de corriente eléctrica a través de las tiras de papel humedecidas por FCG. Presenta dos mandíbulas metálicas que actúan como placas de un condensador eléctrico. De este modo, si se coloca una tira de papel seca, la capacitancia se traslada vía circuito eléctrico y el dispositivo digital de lectura marca cero. Sin embargo, si la tira de papel está húmeda, la capacitancia aumentará en proporción al volumen de fluido, produciendo un aumento del valor que aparece en pantalla. Se trata de una técnica rápida sin alteración en la muestra de FCG para permitir el posterior análisis de laboratorio. Como limitaciones, destaca la incapacidad del Periotron® para medir volúmenes mayores a 2µl a pesar de que las tiras de papel pueden absorber más de este volumen. Esto es importante porque habitualmente, las zonas con mayor inflamación pueden aparecer volúmenes elevados de FCG. Derivadas de los estudios de calibración del Periotron® se proponen las siguientes recomendaciones:
  - o cada máquina necesita su propia calibración
  - o el material más adecuado para la calibración es el suero humano
  - o se necesita una jeringa con alta precisión para dispensar los volúmenes
  - o se requieren volúmenes duplicados y un rango completo de volúmenes desde 0,1 a 1,2 µl para generar una curva adecuada de calibración (Griffiths, 2003).



**Figura 9.** Imagen del Periotron®.



**Figura 10.** Método de tira de papel. Periopaper® introducido en el surco por método intracrevicular.

### **2.2.3.3. Problemas con la toma de muestras de FCG y la interpretación de datos**

#### **Contaminación de muestras**

La sangre, saliva y la placa dental son las causas de contaminación de muestras más habituales. Para la determinación del volumen de la muestra, la presencia de placa dental ha demostrado presentar un impacto importante en la determinación del volumen (Stoller y cols., 1990). Se necesita un cuidadoso aislamiento del campo de toma de muestra para poder minimizar la contaminación por parte de la saliva. Los estudios demuestran que la contaminación salival de las muestras es escasa si se realiza con un buen aislamiento (Griffiths y cols., 1992; Griffiths, 2003).

#### **Determinación del volumen y análisis del FCG.**

La evaporación de la muestra es un problema habitual a la hora de determinar el volumen, y es más acusada cuanto menor es el volumen de la muestra. Es muy importante tener en cuenta la evaporación y realizar el proceso de lectura de tira de papel y transporte para su almacenaje lo más rápido posible (Griffiths, 2003).

Tras la determinación del volumen, las tiras de papel pueden emplearse en el laboratorio para analizar la composición del FCG. La técnica de centrifugación ha demostrado que es capaz de recuperar el cien por cien de las proteínas del FCG (Cimasoni, 1983).

Respecto a la presentación de datos, las muestras de FCG se presentan como cantidad absoluta ( $\mu\text{g}$ ) y/o concentración ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Griffiths, 2003).

### **2.2.3.4. Componentes del FCG**

En la composición global del FCG intervienen tanto productos derivados del metabolismo bacteriano como del hospedador, y diferenciar su origen es complicado. Se describe como una mezcla de moléculas procedentes de sangre, tejidos y placa subgingival; incluyendo: citocinas, electrolitos, pequeñas moléculas orgánicas, proteínas, anticuerpos, antígenos bacterianos, y enzimas del hospedador y bacterianas (Delima and Van Dyke, 2003).

En cuanto al componente celular, en el FCG pueden encontrarse células bacterianas, células epiteliales descamadas y leucocitos (incluyendo polimorfonucleares (PMNs), monocito/macrófagos y linfocitos). El 90% de las células del FCG son PMNs, que gracias a la acción bactericida y fagocítica actúan contra la invasión bacteriana como primera línea de defensa. En ocasiones pueden encontrarse eritrocitos que resultan del

daño de pequeños vasos y capilares debido a la inflamación progresiva (Delima and Van Dyke, 2003).

Algunas moléculas como enzimas y anticuerpos presentes en el FCG ayudan a que el epitelio y el conectivo subyacente puedan mantener la homeostasis. Las células epiteliales, con un papel muy activo en el proceso inflamatorio, pueden segregar distintas proteinasas en el FCG, como son las colagenasas: metaloproteasas (MMPs) MMP2, MMP7, MMP9, MMP13. Estas MMPs pueden detectarse y analizarse en el FCG mediante ensayos inmunológicos, ensayos de degradación de sustrato y medidas de metabolitos de colágeno (Uitto y cols., 2003).

Otros tipos de enzimas que se pueden hallar en el FCG son las producidas por las células bacterianas. Los periodonto-patógenos son capaces de segregar enzimas proteolíticas bacterianas como: proteinasas tipo tripsina, proteinasas colagenolíticas, aminopeptidasas y otras proteasas. También pueden encontrarse enzimas hidrolíticas: ácido/alcalin fosfatasa, hialuronidasa, condroitinasa etc. (Eley y Cox, 2003).

Otros marcadores específicos como la piridinolina reticulada (piridinolina, desoxipiridinolina, N-telopéptido y C-Telopéptido) que representa un tipo de moléculas derivadas del metabolismo óseo, pueden encontrarse en el fluido crevicular gingival. Otros como la Osteocalcina, los proteoglicanos, otros componentes de la matriz extracelular y los factores de crecimiento (factor de crecimiento epidermoide y factor de crecimiento tumoral-alfa/beta) también pueden encontrarse en el FCG, aunque los estudios indican que son buenos indicadores del recambio óseo, pero no buenos predictores de la futura progresión de la destrucción periodontal (Giannobile y cols., 2003). Además, se pueden encontrar diversos compuestos orgánicos entre los que destaca la glucosa, que en fluido crevicular se encuentra aumentada de tres a cuatro veces más que en sangre (Embery y cols., 2000).

El surco gingival es el escenario donde se produce la presentación de los antígenos bacterianos, en un entorno bañado por el fluido crevicular gingival. Incluso en encía sana, se puede observar en el transudado inmunoglobulina G (IgG) y A (IgA) en una ratio comparable a la encontrada en suero. Con la inflamación activa de los tejidos periodontales, aumentan las células plasmáticas existiendo niveles altos de IgG y bajos de IgA en FCG. Un aspecto importante en la respuesta humoral en la periodontitis es la relación entre los anticuerpos a nivel local y a nivel sistémico. Se ha encontrado una relación positiva entre los anticuerpos en el suero plasmático y la respuesta local gingival frente a microorganismos. Algunos autores proponen que la detección y análisis de estos

Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada  
marcadores humorales o anticuerpos en el FCG pueden reflejar el nivel de infección local y el riesgo de progresión de la enfermedad, aunque se necesitan investigaciones clínicas bien diseñadas que apoyen estos datos (Ebersole, 2003).

#### **2.2.3.5. Potencial interés del FCG**

Desde que la respuesta del hospedador se ha destacado como un factor determinante en la patogénesis periodontal, la medida de los niveles de marcadores inflamatorios en el FCG se ha empleado para evaluar el riesgo periodontal. Se pudo constatar que los niveles de estos marcadores aumentaban con el tiempo en pacientes periodontales y que no eran sitio-dependientes sino paciente-dependientes (Champagne y cols., 2003).

La toma de FCG es un procedimiento mínimamente invasivo que permite el análisis de sus componentes. Se destaca como un medio bioquímico útil para la evaluación del metabolismo celular local.

#### **FCG en salud e inflamación: Cambios celulares y bioquímicos.**

En tejidos sanos, prevalecen los microorganismos cocos gram positivos, y ante este desafío, el FCG representa un exudado seroso o transudado. Cuando se instaura un cuadro clínico de gingivitis, se produce un aumento en la permeabilidad y vasodilatación que favorece la salida del FCG. Este se define ya como un exudado de neutrófilos polimorfonucleares (Page y Beck, 1997).

Algunos de los marcadores que se identifican en gingivitis son: leucotrienos, factor activador de plaquetas, tromboxanos, elastasa, colagenasas (MMPs). Tonetti y cols., 1998, demostraron que el aumento en la IL-8 es uno de los marcadores bioquímicos más tempranos asociado al cambio de salud a gingivitis.

En periodontitis, los microorganismos gram negativos colonizan los tejidos más en profundidad y perpetúan la respuesta inflamatoria crónica del hospedador. A nivel bioquímico, los lipopolisacáridos bacterianos inducen una liberación de mediadores inflamatorios por parte de los monocitos (PGE<sub>2</sub>, Interleucinas, MMPs, TNF, etc.) que pueden detectarse en FCG (Champagne y cols., 2003).

Por tanto, los niveles en los mediadores derivados de neutrófilos y monocitos analizados en el FCG pueden indicar la capacidad de respuesta del hospedador, y derivado

de ello, evaluar el riesgo de desarrollar enfermedades periodontales (Page y Beck, 1997; Champagne y cols., 2003).

### **El FCG como medio diagnóstico: Presente y perspectivas de futuro**

La “habilidad” para sintetizar mediadores inflamatorios en respuesta al desafío bacteriano es lo que marca la susceptibilidad del hospedador frente a la enfermedad. De modo que, los factores genéticos y los relacionados con el entorno cambiante y dinámico, son los que definirán un perfil de respuesta de paciente hipo, normo o hiper-reactivo (Champagne y cols., 2003).

El análisis del FCG puede considerarse un método diagnóstico muy poco invasivo y útil para analizar moléculas presentes en el proceso inflamatorio-destructivo, siendo un punto de máximo interés en el estudio de las enfermedades periodontales (Page, 1992).

En el fluido crevicular gingival se ha analizado una lista numerosa de mediadores inflamatorios y productos de destrucción tisular, sin embargo, probablemente con el tiempo los avances permitirán que se puedan encontrar otros marcadores que puedan aportar más información a la patogénesis periodontal y ayudar en el diagnóstico, prevención y quizás en el tratamiento de las enfermedades periodontales. En este sentido, un campo muy prometedor que podría aportar luz sobre las influencias del entorno que tanto modifican la respuesta inmuno-inflamatoria del hospedador, podría ser el campo de la epigenética.

## **2.3. Patogenia Periodontal**

Según el diccionario de términos médicos de la Real Academia Nacional de Medicina, la patogénesis o patogenia se define como la causa y desarrollo de una enfermedad o trastorno. Es fundamental conocer y entender cuáles son las condiciones de las enfermedades periodontales y cuál es el proceso inmuno-inflamatorio que el hospedador desarrolla para intentar prevenir el daño.

### **2.3.1. El Biofilm**

La microbiota oral humana está formada por más de 1200 especies bacterianas, que son capaces de colonizar diferentes superficies duras no descamables estableciéndose como un *biofilm dental* (Filoche y cols., 2010). Con los nuevos avances en metagenómica, se espera que en los próximos años estos valores de recuento aumenten.

El *biofilm* dental es una comunidad bacteriana compleja. Constitutivamente presenta una o más comunidades de microorganismos que se encuentran embebidos en una matriz o glicocalix que le permite adherirse a las superficies sólidas (Costerton y cols., 1994; Flemming y cols., 2016). El *biofilm* dota a las bacterias que viven en su ecosistema de múltiples ventajas respecto a las bacterias que viven en estado sesil o planctónico (Socransky y Haffajee, 2002).

Al analizar la composición de la biopelícula dental, encontramos una matriz o glicocálix que ocupa del 75 al 80% del volumen y microcolonias de células bacterianas que suponen del 15 al 20% restante. Entre estas microcolonias se pueden observar canales de agua, que constituyen un verdadero microsistema circulatorio para el *biofilm* (Socransky y Haffajee, 2002). La matriz está formada en su mayoría por exopolisacáridos, que no solo actúan como el “esqueleto” que mantiene la integridad del *biofilm*, sino que al estar sintetizado por las propias bacterias es capaz de adaptarse a diferentes cambios y puede ser degradado para la obtención de nutrientes por las mismas células bacterianas (Socransky y Haffajee, 2002; Flemming y cols., 2016).

Todas estas peculiaridades dotan a las células bacterianas que habitan el *biofilm* de múltiples ventajas que les van a permitir sobrevivir y perpetuar el estímulo inflamatorio crónico causante de las enfermedades periodontales.

La heterogeneidad biológica presente en la biopelícula permite que distintas bacterias con diferentes habilidades sean capaces de vivir juntas creando un ecosistema que les permite protegerse, crecer y obtener nutrientes gracias a la cooperación existente entre ellas para el bien de la comunidad (Flemming y cols., 2016). Esta heterogeneidad, permite que células de la misma especie exhiban diferentes estados fisiológicos en el *biofilm*, y que estas se estructuren en diferentes capas bacterianas: anaerobias-facultativas-aerobias y exista variación en el PH, haciendo más difícil la colonización en la biopelícula a otras bacterias o distintos agentes químicos antimicrobianos. La compleja estructuración del *biofilm*, con sus distintas capas, canales de agua y la matriz de glicocálix protege a las células bacterianas que habitan en él, y a su vez las capacitan para generar enzimas, como las  $\beta$ -lactamasas, capaces de desarrollar resistencias a los antimicrobianos (Socransky y Haffajee, 2002).

La proximidad celular habitando dentro de la matriz, hace que sea posible la comunicación interbacteriana, es lo que se denomina “*quorum sensing*”. El “*quorum sensing*” se puede definir como la regulación de la expresión de genes específicos a través de la acumulación de señales químicas que median en la comunicación extracelular.

Permite a las bacterias protección frente a agentes externos, como podrían ser las defensas del hospedador, agentes antisépticos o antibióticos etc. Esta comunicación intercelular también puede regular el crecimiento de ciertas colonias beneficiosas para el ecosistema bacteriano e inhibir el crecimiento de las perjudiciales. Además, también se ha demostrado que este “*quorum sensing*” es capaz de alterar el comportamiento fisiológico de las bacterias para adaptarse a cambios ambientales (Socransky y Haffajee, 2002).

El “*quorum sensing*” permite el trasiego de información para que las distintas comunidades bacterianas regulen su comportamiento para el beneficio común del biofilm.

La expresión génica bacteriana se activa al alcanzar cierto umbral o “*quorum cell density*” que va a depender sobretodo de la densidad celular. Las moléculas de señalización *N-acyl homoserin lactone (AHL)* se unen al receptor LuxR (*LuxI gene*) para activar ciertos genes diana (Socransky y Haffajee, 2002). Existen otros métodos de transmisión de información genética entre bacterias como por ejemplo la conjugación, transformación y transferencia de plásmidos y transposones (Christensen y cols., 1998; Socransky y Haffajee, 2002).

El crecimiento lento de las células que habitan los estratos profundos de la biopelícula, el distinto potencial redox entre las diferentes capas de la matriz, el diferente PH entre capas, el estado nutricional favorecido por la posibilidad de degradar la matriz para adquirir nutrientes, la función homeostática o buffer de la matriz, la producción de enzimas como las  $\beta$ -lactamasas, el “*quorum sensing*” y la exposición a dosis subefectivas; hacen que las bacterias que habitan un *biofilm* presenten de 1000-1500 veces más resistencias a antibióticos que las bacterias en estado planctónico (Steward y cols., 2000; Socransky y Haffajee, 2002).

Por tanto, la transmisión de información genética entre células bacterianas se destaca como un mecanismo muy importante de resistencia bacteriana, no solo frente a la defensa inmuno-inflamatoria por parte del hospedador sino también frente a diferentes agentes antimicrobianos. Es decir, el modo de vida de las bacterias en la placa dental en forma de *biofilm*, les permite iniciar el estímulo inflamatorio y poder resistir el ataque contra ellas, perpetuando la inflamación y suponiendo un estímulo inflamatorio crónico destructivo característico de la periodontitis. Todo esto producirá unos cambios a nivel genético y epigenético fundamentales para entender la diferente expresión fenotípica que puede aparecer dentro de la misma especie bacteriana y como estos cambios pueden variar la susceptibilidad y respuesta al tratamiento en las enfermedades periodontales.



### 2.3.2. Patógenos

Dentro de estas comunidades vivas y dinámicas que son los *biofilms*, se pueden encontrar cientos de especies bacterianas distintas. Pero no todas ellas parecen tener una clara asociación con la destrucción periodontal. Algunas presentan unas características especiales y unos factores de virulencia específicos que las asocian a la periodontitis, son las denominadas bacterias patógenas periodontales o microorganismos periodontopatógenos.

Cuando son capaces de iniciar y perpetuar el estímulo inflamatorio que llevará a la creación de unas condiciones óptimas para su hábitat, se denominan “*keystone pathogens* o patógenos clave”; y cuando se aprovechan del cambio en las condiciones del medio, se denominan “*patobiontes*” (Hajishengallis, 2014).

El proceso de maduración de la placa bacteriana permite la elaboración de un microsistema que favorece la vida de estos periodontopatógenos que requieren unas condiciones ambientales muy exigentes.

El esmalte se cubre de una “película adquirida” compuesta por material orgánico formado por más de 180 péptidos, proteínas y glicoproteínas. Compuestos como queratinas, mucinas, proteínas ricas en prolina, fosfoproteínas, proteínas ricas en histidina y otras moléculas, sirven de receptores para la adhesión bacteriana. Algunas proteínas presentes en las bacterias como las adhesinas son reconocidas por receptores de la película que mediante una interacción específica permiten la adhesión de los primeros microorganismos o colonizadores primarios. Estos colonizadores primarios son bacterias gram positivas, en su mayoría cocos, que servirán de puente de unión para la agregación bacteriana (Socransky y Haffajee, 2005).

Con la colonización inicial, se empieza a producir un cambio en el ecosistema, disminuyendo la tensión superficial y la concentración de oxígeno, es decir, se empieza a crear un ecosistema que favorece la vida de las bacterias Gram negativas anaerobias (Socransky y Haffajee, 2005). Las colonizadoras tardías, se unen a estas bacterias y se produce la co-agregación bacteriana. Este proceso de co-agregación es muy complejo, y se han descrito la existencia de interacciones específicas entre distintos grupos o especies bacterianas (Socransky y Haffajee, 2005).

Socransky y Haffajee (2002), clasifican distintas especies bacterianas en lo que ellos denominan “*Complejos Bacterianos de Socransky*” (Socransky y cols., 1998). De esta forma pretenden agrupar las distintas especies bacterianas en función de su virulencia y

asociación con la periodontitis. La base de la pirámide muestra los complejos azul (*Actinomyces*), verde (*Capnocytophaga* y *AA subtipo a*), violeta (*Veionella*) y amarillo (*Streptococos*); como primeros colonizadores. El complejo naranja sería considerado como colonizadores secundarios, que servirían de puente para los estadios más tardíos de co-agregación, que se relacionarían con la patología periodontal, el complejo rojo.

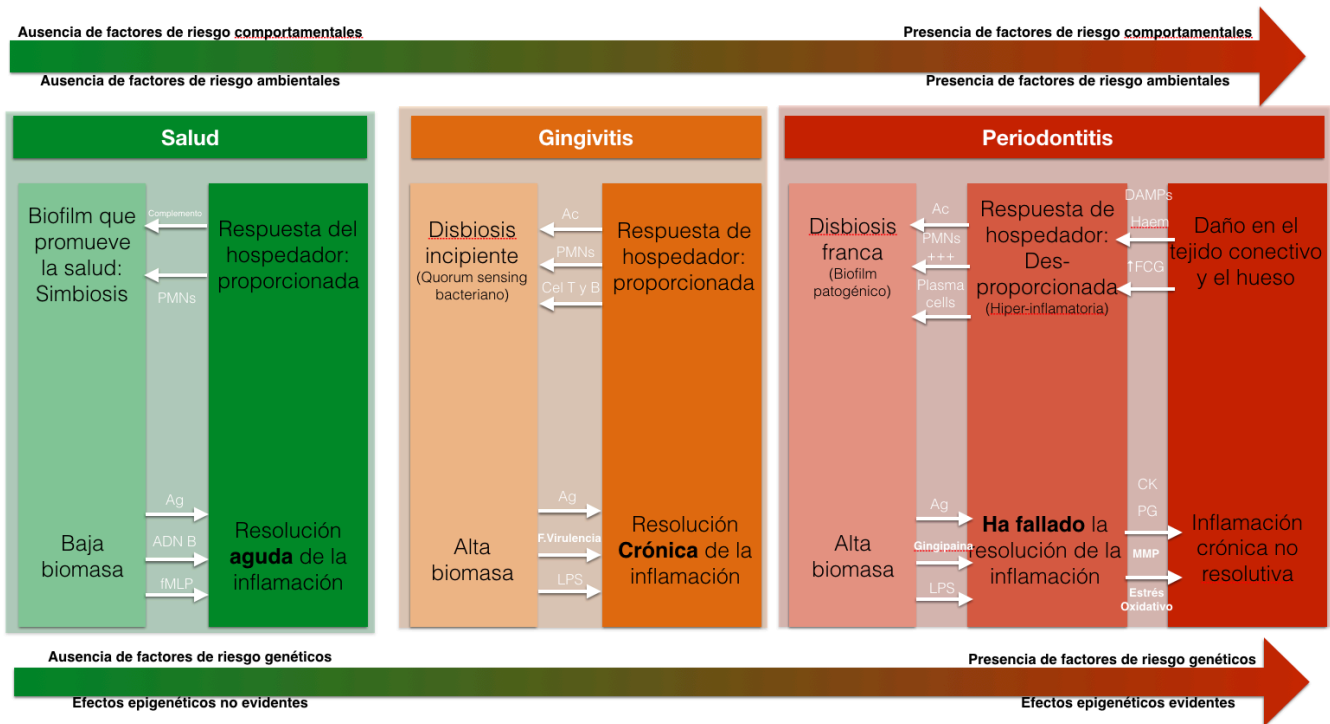
Este complejo rojo corresponde a los periodontopatógenos: *Porphyromonas Gingivalis* (PG), *Tannarella Forsythus* (TF), *Treponema Denticola* (TD). Además de estas tres existen otras bacterias estrechamente relacionadas con las enfermedades periodontales; como por ejemplo el *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* (AA) que se ha relacionado con periodontitis agresivas, la *Prevotella Intermedia* (PI) y recientemente *Staphylococcus Aureus* y *Epidermidis* en las enfermedades periimplantarias (Socransky y cols., 1991; Socransky y cols., 1998).

Algunos de los factores de virulencia descritos en estos periodontopatógenos son: factores que promueven la colonización (adhesinas y fimbrias), toxinas y enzimas que degradan los tejidos periodontales (proteasas, gingipainas, leucotoxinas) y factores que protegen a las bacterias periodontopatógenas (producción de una cápsula extracelular, degradación proteolítica de componentes de la inmunidad, invasión celular) (Socransky y cols., 1998).

### **2.3.3. Biología molecular de la respuesta inmuno-inflamatoria**

Conocer la patogénesis periodontal es primordial para realizar un correcto diagnóstico y planificar adecuadamente el tratamiento de las enfermedades periodontales en cada paciente.

Para el inicio y avance de la periodontitis debe existir un agente causal o iniciador, las bacterias. Pero lo verdaderamente importante no es solo que existan bacterias, sino que la presencia de estas ocasione una cascada de señalización inmuno-inflamatoria que ponga en marcha una respuesta dirigida a atacar a estas células bacterianas. La variabilidad interindividual hace que esta respuesta pueda ser desproporcionada en algunos hospedadores, ocasionando una mayor agresividad o progresión de la periodontitis (Page y Kornman, 1997; Meyle y Chapple, 2015) (Figura 11).



**Figura 11.** Este esquema aparece en el artículo de Meyle y Chapple (2015). A través de este diagrama se pretende ilustrar los factores implicados en el modelo multifactorial de la patogénesis de la periodontitis.

El esquema de la figura 11, original del artículo de Meyle y Chapple (2015), sirve para ilustrar la relación entre los factores de riesgo ambiental o comportamental, la presencia del biofilm, la respuesta inmuno inflamatoria del hospedador, así como la implicación de los factores de riesgo genéticos y epigenéticos con la homeostasis tisular. La relación entre todos estos factores puede desencadenar en una adecuada simbiosis, una disbiosis o desequilibrio incipiente o a una disbiosis franca (Meyle y Chapple, 2015).

En el desarrollo y progresión de las enfermedades periodontales existe un desajuste entre los factores que determinan la situación de homeostasis entre el desafío bacteriano y la respuesta inmuno-inflamatoria del hospedador. La prueba de ello se muestra en el estudio clásico de Løe y cols. (1986) en trabajadores del té en Sri Lanka que no tenían acceso a atención dental. Løe y cols. observaron que en torno al 8% de estos individuos presentaban una progresión muy rápida de la periodontitis, un 84% tenían una progresión moderada, y un 11% no presentaban mayor afectación que inflamación gingival, es decir, no padecían periodontitis (Løe y cols., 1986).

En otras palabras, la respuesta inmuno-inflamatoria puede ser no adecuada en determinados individuos y/o ante determinadas situaciones, y la respuesta que iba

encaminada a anular el ataque bacteriano puede producir una destrucción desmedida de los tejidos de soporte (Page y Kornman, 1997). El desafío bacteriano inicia y perpetúa la respuesta inflamatoria, pero es la susceptibilidad del individuo la que determina que se produzca o no la destrucción de tejidos periodontales.

Algunas de las biomoléculas que se encargan de regular la homeostasis del periodonto, aunque su función es velar por la salud, paradójicamente, en realidad son responsables de la destrucción de los tejidos (Page y Kornman, 1997). Estas moléculas, se ven influenciadas en buena medida por el estilo de vida o por factores ambientales que actúan sobre el individuo, siendo notable la influencia que estos considerados factores de riesgo pueden tener en el inicio, progresión y respuesta al tratamiento.

La genética, el sexo, pero sobretodo el control de placa bacteriana y algunos estilos de vida, son los factores de riesgo claramente relacionados con la periodontitis. Deben destacarse también la diabetes mellitus y el hábito tabáquico. Los fumadores, tienen de 2-7 veces más probabilidad de padecer periodontitis. El efecto del tabaco en los tejidos periodontales es dosis-dependiente, de modo que los “grandes fumadores” tienen 2 veces más probabilidad de pérdida de inserción clínica y ósea que los “poco fumadores” (Philstrom, 2001). La nicotina puede inducir cambios en la regulación epigenética afectando a la expresión de algunos genes implicados en la respuesta inflamatoria (Soma y cols., 2006). Un mal control de la diabetes en presencia de cálculo se asocia con mayor frecuencia de bolsas periodontales  $\geq 4\text{mm}$  (Genco y cols., 2005; Philstrom, 2001).

#### 2.3.4. Estadios histológicos y clínicos

Se distinguen cuatro etapas o estadios histológicos en la gingivitis y periodontitis: Lesión inicial, temprana, establecida y avanzada (Page y Schroeder, 1981).

- **Lesión inicial:** Se desarrolla a los 4 días de acumulación de placa. En este primer estadio que corresponde a una encía clínicamente sana. A nivel histológico, se puede observar: vasodilatación y permeabilidad aumentados, salida de fluido crevicular gingival (FCG) al surco, y migración de leucocitos sobretodo neutrófilos al conjuntivo, epitelio de unión y surco. Las moléculas de adhesión *ICAM-1* y *E-selectina* facilitan esta migración.
- **Lesión temprana:** Aparece una semana después de dejar que se forme la placa. Corresponde a los primeros signos clínicos de gingivitis. Histológicamente se observa: aumento de permeabilidad vascular con salida de FCG, infiltración de neutrofilos y

linfocitos, alteración metabólica en los fibroblastos con predominio de la acción catabólica de colágeno en conectivo, y proliferación de epitelio de unión y del surco en áreas de destrucción de colágeno. Clínicamente aparece edema y profundización de surco gingival favoreciendo el crecimiento de la biopelícula a un nivel cada vez más apical.

- **Lesión establecida:** Se corresponde clínicamente con la gingivitis crónica. La histología ilustra: un denso infiltrado inflamatorio en conectivo con linfocitos, neutrófilos y células plasmáticas. Se observa destrucción de colágeno y proliferación de epitelio. A nivel molecular, estos neutrófilos generan altas cantidades de MMPs. Clínicamente se profundiza el surco y la ulceración que produce la introducción de la sonda periodontal en los vasos dilatados produce el signo clínico de sangrado al sondaje.
- **Lesión avanzada:** Este estadio marca la transición de gingivitis a periodontitis. Todavía hoy en día se desconocen los factores que llevan a la transición de gingivitis a periodontitis. A nivel histológico aparece un predominio de neutrófilos en el epitelio del surco, un infiltrado inflamatorio denso en conectivo dominado por células plasmáticas, migración apical del epitelio de unión y degradación del colágeno del conectivo, y se produce la reabsorción ósea. Clínicamente aparece la bolsa periodontal con un surco profundizado que favorece el hábitat de bacterias periodontopatógenas gram negativas anaerobias, que perpetúan el estímulo inflamatorio crónico y la destrucción tisular concomitante (Page y Schroeder, 1981).

### 2.3.5. Mediadores inflamatorios del hospedador

Posiblemente la respuesta inmuno-inflamatoria del hospedador frente a la biopelícula bacteriana es una de las situaciones que puede determinar la susceptibilidad del individuo a la periodontitis. El estudio de algunas moléculas inflamatorias sugiere que aunque su función es proteger, su producción excesiva y no regulada lleva a la destrucción del periodonto y consecuentemente a la progresión de la periodontitis.

Los lipopolisacáridos (LPS) presentes en las células bacterianas son reconocidos por receptores tipo *Toll* en distintas células del periodonto. Este reconocimiento de patrones bacterianos lleva a una señalización intracelular con liberación de moléculas proinflamatorias. Podemos agrupar estas biomoléculas en citocinas, prostaglandinas y metaloproteasas de la matriz (MMPs) (Page, 1991).

Las citocinas son unas proteínas solubles que al unirse a los receptores de la membrana celular, inician una señalización que produce cambios en el fenotipo celular (Birkedal-Hansen, 1993; Seymour y Taylor, 2004; Taylor y cols., 2004). Este proceso conduce a una retroalimentación positiva que establece una situación de inflamación crónica. A su vez, las citocinas son capaces de inducir en un gran número de células la secreción de otras moléculas que pueden desencadenar destrucción tisular. Dentro de la familia de las citocinas en relación con las enfermedades periodontales destacan la IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  que son muy importantes en el inicio, regulación y perpetuación de la respuesta inmune (Gemmell y cols., 1997).

En la patogenia de la enfermedad periodontal se establece una compleja red de interacciones moleculares. Se ha visto que el aumento de IL1- $\beta$  estimula la síntesis de Prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), factor activador de plaquetas, óxido nitroso e ICAM-1, que a su vez promueven cambios vasculares que favorecen la migración celular y la inflamación (Delaleu y Bickel, 2004). La IL1- $\alpha$ , es una proteína intracelular que se localiza en el medio cuando se produce la muerte de la propia célula actuando como una alarma que se ha relacionado fuertemente con la pérdida ósea (Tanabe y cols., 2005). Existen otras citocinas como la IL6, IL11, IL18, que también se las ha relacionado con la destrucción periodontal (Taylor y cols., 2004). El TNF- $\alpha$  estimula el desarrollo de osteoclastos y es secretado en respuesta a LPS bacterianos. El TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  se implican en el eje RANK/RANKL/OPG muy importante en la regulación del metabolismo óseo. Assuma y cols. (1998), demostraron que la aplicación de antagonistas de estas dos moléculas producía un 60% menos de pérdida ósea.

Las prostaglandinas derivan del ácido araquidónico que es metabolizado por la ciclooxigenasa 1 y 2 (COX 1 y 2), generando compuestos prostanoides de los que destaca por su fuerte relación con la periodontitis, la PGE<sub>2</sub>. Esta, produce vasodilatación e induce liberación de citocinas proinflamatorias. La COX 2 se estimula por los LPS bacterianos, el TNF- $\alpha$  y la IL1- $\beta$ , aumentando la producción y liberación de PGE<sub>2</sub>. La PGE<sub>2</sub> produce aumento de MMPs y reabsorción osteoclástica mostrándose fuertemente asociada como molécula causante de la destrucción tisular en la periodontitis (Vardar y cols., 2003; Tanabe y cols., 2005).

Por último, el grupo de las MMPs. Se trata de unas moléculas proteolíticas que degradan la matriz extracelular (Hannas y cols., 2007). Estas MMPs se liberan en estado inactivo y cuando contactan con proteasas como la catepsina G se activan (Birkedal-Hansen, 1993). La regulación de la acción proteolítica de las MMPs está regulada en suero

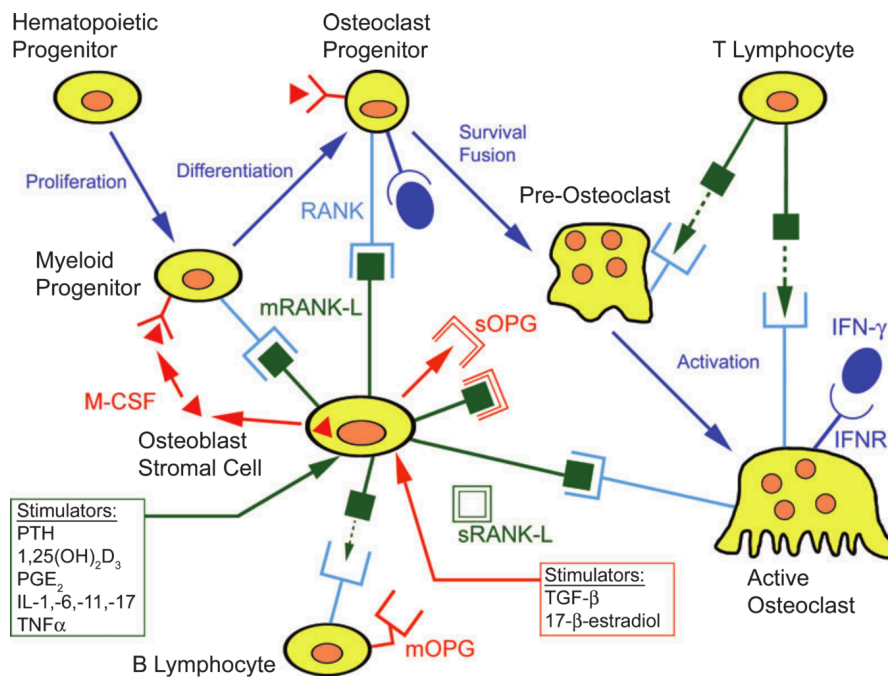
Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada por  $\alpha$ -1 antitripsina y  $\alpha$ -2 macroglobulina; y a nivel tisular, por los inhibidores del tejido de las metaloproteasas (TIMP). La transcripción de genes que codifican para MMPs viene estimulada por TNF- $\alpha$  y la IL1- $\beta$  lo que de nuevo viene a resaltar la gran interacción intermolecular existente (MacNaul y cols., 1990).

Por lo tanto, ante un estímulo, en el caso de la periodontitis, por ejemplo, el LPS bacteriano, el reconocimiento celular de este LPS lleva a una cascada de señalización que induce la secreción de moléculas proinflamatorias como la TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , MMP, PGE<sub>2</sub>, y otras muchas que establecen un estado inflamatorio que se autoperpetúa y que está regulado por otras muchas moléculas a través de una compleja red de interacción biomolecular. La respuesta desmedida por parte del hospedador se caracterizará por presentar una proporción desmesurada de moléculas proinflamatorias con escasa regulación, siendo la susceptibilidad del hospedador la que se traducirá en destrucción o progresión de pérdida de tejidos periodontales.

### **2.3.6. Moléculas relacionadas con la fase resolutive de la inflamación**

El papel que desempeñan algunas moléculas en la regulación y resolución del proceso inflamatorio, son de especial importancia en la patogénesis periodontal.

El eje RANK (Receptor activador para el *nuclear factor- $\kappa$ B*) / RANK-L (Ligando para el receptor activador para el *nuclear factor- $\kappa$ B*) / OPG (Osteoprotegerina) es clave para la regulación del recambio óseo. NF- $\kappa$ B, es el factor de transcripción más importante en la remodelación ósea. Su activación se asocia con liberación de moléculas proinflamatorias. RANK es un receptor membrana que se encuentra en las células progenitoras de osteoclastos. RANK-L se une a RANK y activa a los osteoclastos induciendo la resorción ósea. Cuando OPG se une a RANK-L produce el efecto contrario, inhibe la diferenciación a osteoclasto. El aumento en las citocinas TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  y el aumento de linfocitos T, favorece la unión de RANK-L a RANK, produciendo resorción ósea (Nanci y Bosshardt, 2006). Los estudios demuestran que el ratio RANK-L: OPG es mayor en periodontitis que en salud, existiendo bajas proporciones de OPG (Crotti y cols., 2003). Es evidente por tanto la gran importancia de estas moléculas en la patogénesis periodontal y más concretamente en la remodelación de los tejidos óseos (Figura 12).



**Figura 12.** Dibujo esquemático del sistema RANK-RANKL-OPG (Obtenido del artículo de Nanci y Bosshardt, 2006)

En cuanto a las lipoxinas, resolvinas y protectinas, son moléculas activas que se sintetizan en las fases de resolución de inflamación, son antiinflamatorias e inhiben la infiltración celular (Hong y cols., 2003; McMahon y Godson, 2004). Estas moléculas “desactivan la inflamación”, reduciendo la migración de neutrófilos y otras células. Señalizan células a macrófagos para la fagocitosis tras la apoptosis, inhiben la secreción de mediadores proinflamatorios y tienen efectos anti-inflamatorios e inmunoreguladores (Serhan, 2008; Van Dyke, 2008). Hasturk y cols., (2007), vieron en animales con periodontitis experimental, que tras la aplicación de resolvinas en concreto *RvE1*, se conseguía frenar la progresión de la periodontitis y revertir la pérdida ósea en comparación con el grupo control. Estos experimentos vuelven a destacar el papel de la susceptibilidad en la periodontitis, mostrando que los procesos que llevan a la resolución de la inflamación, pueden ser un posible punto de inflexión en el paso hacia pérdida de soporte periodontal. Así se presenta un interesante campo de investigación para el tratamiento de las enfermedades periodontales.



## 2.4. Genética

### 2.4.1. Conceptos claves y relación con las enfermedades periodontales

La herencia de los rasgos ha suscitado interés desde hace miles de años. Los antiguos hebreos, los griegos y eruditos de la edad media ya describieron fenómenos genéticos y propusieron distintas teorías. Pero no es hasta mediados del siglo XIX cuando Gregor Mendel, un monje austríaco considerado el “padre de la genética”, realizó una serie de experimentos en plantas de guisantes que le sirvieron para formular los principios fundamentales de la herencia. En 1865 publicó sus investigaciones, pero hasta 35 años después no obtuvo ningún reconocimiento. En el 1909, Johanssen emplea el término Gen para describir la unidad básica de la herencia. En los años siguientes se realizaron muchas investigaciones experimentales y teóricas. Ronald Fisher, J. B. S. Haldane y Sewall Wright desarrollaron la base de la genética poblacional. Más tarde en el 1944, Oswald Avery pudo demostrar que los genes están formados por ADN (Ácido Desoxirribonucleico).

En el año 1953, se descubre la estructura del ADN. James Watson y Francis Crick en su artículo proponían la conformación de doble hélice, en la cual aparece un apareamiento específico de bases: *“El apareamiento específico que postulamos sugiere un mecanismo posible para copiar el material genético”*. En los años siguientes la investigación se centró en este campo, para tratar de descubrir cómo los genes se transmitían generación tras generación. Su informe original sólo constaba de una página, pero hoy en día sigue siendo la base de lo que consideramos la Genética Molecular, que estudia la estructura y función de los genes a nivel molecular (Jorde y cols., 1996; Watson y cols., 2016).

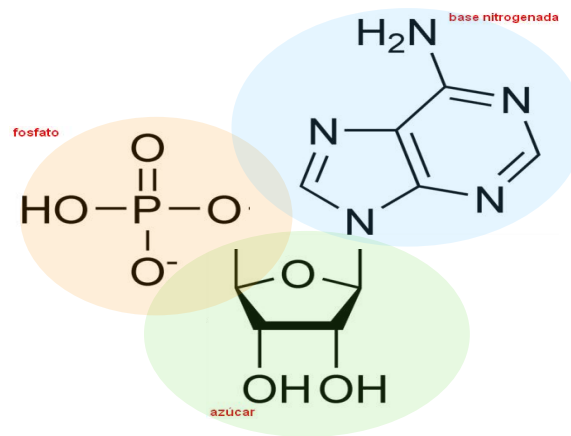
En 1956, se determina que el ser humano presenta 46 cromosomas en cada célula. En los años siguientes y con la ayuda del avance tecnológico, se consiguieron mapear miles de genes. En 1991 empieza el “Proyecto del Genoma Humano”. El genoma hace referencia al conjunto de todos los genes de un organismo. En 2003 se consigue secuenciar por completo el genoma humano, lo que abre una gran vía de investigación.

Se ha demostrado que el genoma no es estático sino dinámico y que se encuentra en continuo proceso de daño-reparación. En ocasiones se produce el cambio en la secuencia de nucleótidos de ADN, es decir se produce una mutación, que puede ocasionar desde cambios muy sutiles, a cambios muy contundentes al afectar a la síntesis de algunas proteínas fundamentales. Pero también hay otra forma de alterar químicamente y de forma reversible los nucleótidos sin cambiar la secuencia de ADN. Estos cambios motivados en

gran medida por el medio ambiente es lo que se denomina Epigenética o “por encima de la genética” (Jorde y cols., 1996; Watson y cols., 2016).

### 2.4.2. Transmisión de la información genética

Existen cuatro bases nitrogenadas (Citosina (C), Timina (T), Adenina (A) y Guanina (G)) que se combinan con un azúcar tipo pentosa (la desoxirribosa) y un grupo fosfato, para formar la molécula de ADN. Cada subunidad de ADN formada por un azúcar, un grupo fosfato y una base es el nucleótido (figura 13).



**Figura 13.** Ilustración de un nucleótido. En la figura se muestra una base purínica de adenina, un anillo de desoxirribosa y un grupo fosfato.

Las Reglas de Chargaff explican como existe una complementariedad entre las bases nitrogenadas, de modo que existirá el mismo número de residuos de A (Adenina) que se complementará con T (Timina), y de G (Guanina) que se complementará con C (Citosina). Los grupos fosfato y azúcar forman cada uno de los lados de “la escalera”, y saliendo de cada lado están las bases nitrogenadas que se unen mediante enlaces débiles de hidrógeno y a modo de analogía forman los peldaños de la escalera. Los extremos de la hélice acaban en 5´ o 3´, números que se corresponden con el orden en que se numeran los átomos de carbono que componen la desoxirribosa. Esta disposición de los nucleótidos entrelazados es lo que Watson y Crick denominaron en 1953 conformación del ADN en doble hélice (Jorde y cols.,1996; Watson y cols., 2016).

A nivel conceptual, el Gen es una unidad de información, de modo que cada cierto tramo de nucleótidos dentro de una molécula de ADN se corresponde con un gen.

Las moléculas de ADN se compactan alrededor de proteínas. Estas proteínas son las Histonas. Estas histonas finalmente se van agrupando y dan origen a los cromosomas. El conjunto de 23 parejas de moléculas o pares de cromosomas que definen a la especie humana constituyen el genoma humano.

El organismo está formado por proteínas, que a su vez se forman por la unión de distintos aminoácidos. Con unos 20 aminoácidos, se pueden formar un gran número de proteínas con funciones y estructuras tan diversas que son capaces de cumplir con todas las funciones celulares del organismo. Cada tres nucleótidos de la molécula de ADN se corresponden con la información para un aminoácido. De modo que, si se fuese leyendo dentro de una molécula de ADN nucleótido a nucleótido, se irían formando aminoácidos que finalmente formarían una proteína; es decir, cada gen codifica para una proteína y el conjunto de genes formaría el genoma humano, capaz de sintetizar todas las proteínas del organismo.

En el núcleo celular el ADN se replica, es decir, rompe sus puentes de hidrógeno para dejar una de sus cadenas desemparejadas para permitir realizar una copia del ADN. La enzima ADN Polimerasa es fundamental en la replicación o copia de ADN, que se realiza en sentido 5'→3' (Jorde y cols., 1996; Watson y cols., 2016).

Francis Crick, en 1956 unos años después de su artículo en el que junto a James Watson proponían la doble hélice de ADN, propone la “*teoría del Dogma Central*” para referirse al mecanismo de transmisión de información genética almacenada en la molécula de ADN o en los genes para formar las proteínas. Según esta teoría, el ADN se duplica y se produce la “transcripción”, proceso mediante el cual se forma una secuencia de ARN a partir de un molde de ADN. El ARN es una molécula similar al ADN, pero con algunas diferencias fundamentales, su azúcar es una pentosa ribosa y presenta Uracilo (U) en lugar de Timina (T); además, suele estar formado por un único filamento.

El ADN se transcribe a ARN mensajero (ARNm), que es la molécula que se encarga de transportar la información desde el núcleo celular a las zonas ribosómicas de síntesis de proteínas en el citoplasma. La transcripción se realiza gracias a la enzima ARN-Polimerasa, que se une al locus promotor del ADN (las regiones promotoras son secuencias de nucleótidos que especifican el inicio de un gen). La ARN-Polimerasa se desplaza en sentido 3'→5' para formar a partir del ADN, un filamento de ARNm

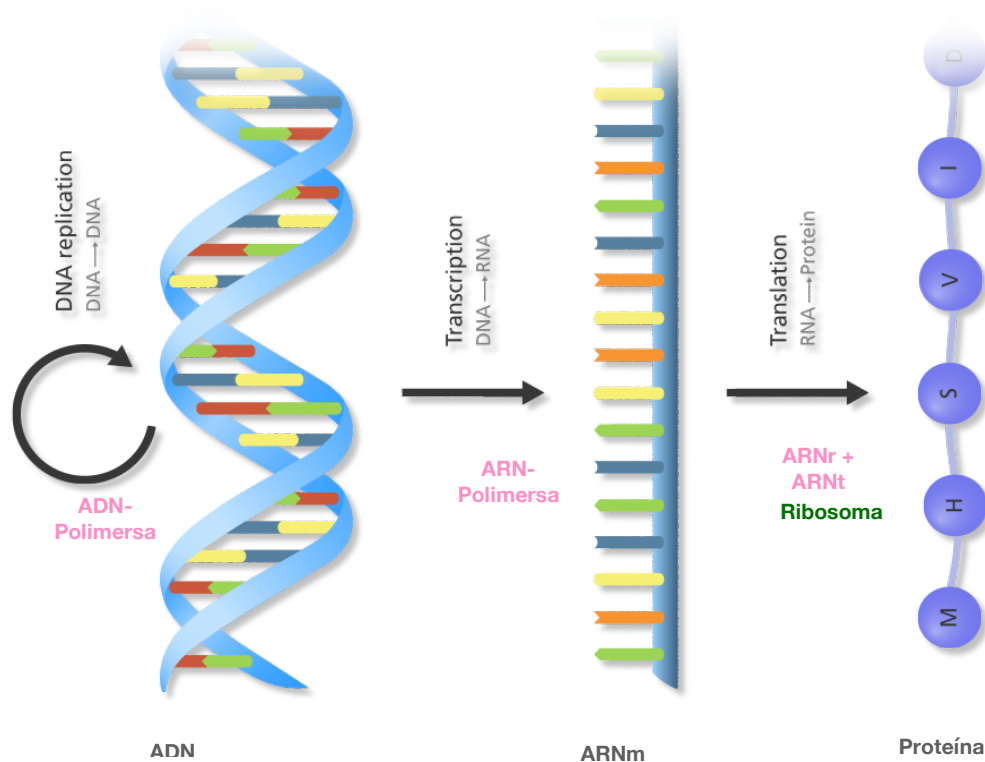
complementario sentido 5'→3'. Así la secuencia de ARN es idéntica a la de ADN, salvo por la sustitución de Timina por Uracilo. Antes de salir del núcleo, los intrones se separan del ARNm, manteniendo los exones (donde se encuentra la información) para codificar proteínas (Jorde y cols., 1996; Watson y cols., 2016).

Los aminoácidos se codifican gracias a unidades de tres bases del ARNm, es lo que se denomina Codón. La correspondencia entre los codones y los aminoácidos se conoce como el Código Genético. Por tanto, se sabe que existen para los 20 aminoácidos, 64 codones posibles, de los cuales 3 indican el final de un gen y se denominan codones de finalización (UAA, UGA, UAG), y los 61 restantes son específicos para los aminoácidos. De este modo es evidente que un aminoácido puede estar codificado por más de un codón (código genético degenerado o degeneración), pero cada codón codifica un único aminoácido (especificidad) (Jorde y cols., 1996; Watson y cols., 2016).

Una vez el ARNm ha salido del núcleo, se produce el proceso de “traducción”, en el que se sintetizará un polipéptido a partir de la información contenida en el ARNm. En este proceso interviene el ARN de transferencia (ARNt), que es un filamento en forma de trébol que contiene aproximadamente 80 nucleótidos. Esta molécula contiene un locus de unión en el extremo 3' para la unión de un aminoácido, y en el extremo opuesto del trébol, un anticodón complementario al codón del ARNm, de modo que la secuencia de aminoácidos se especifica en el ARNt.

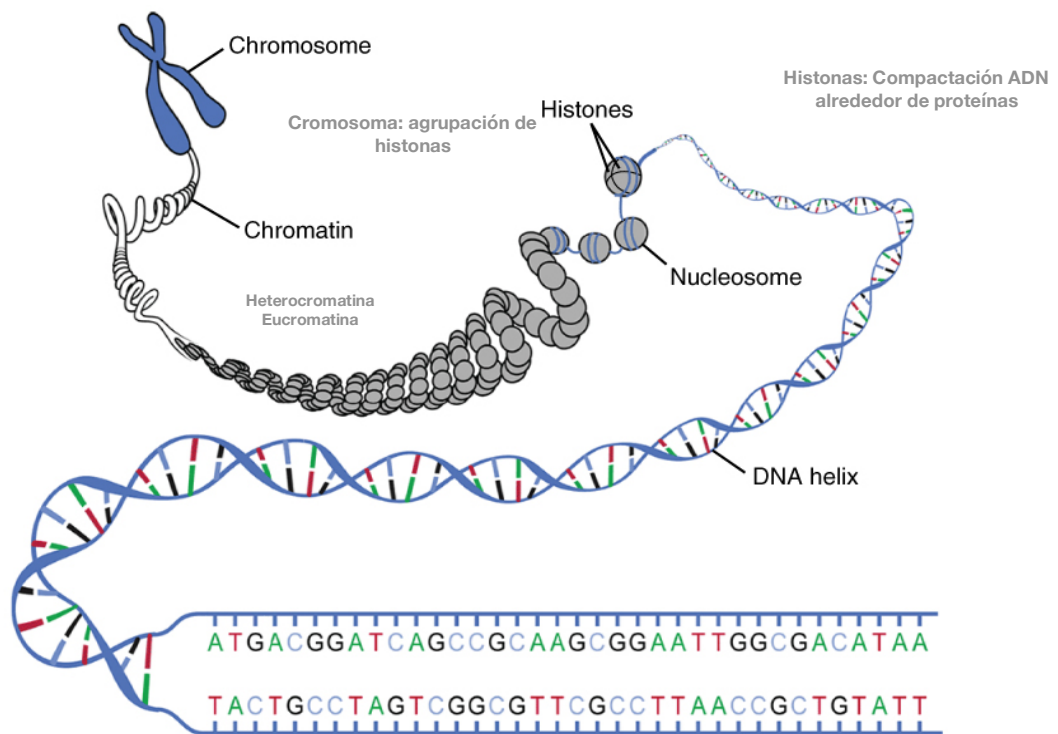
El proceso de síntesis proteica se realiza en el ribosoma. El ARN ribosómico (ARNr) es una molécula que facilita la unión del ARNm y ARNt, de modo que el ARNr se une a una secuencia de inicio (AUG). El ribosoma une ARNt a su superficie para que se produzca el emparejamiento de bases ARNt-ARNm. El ribosoma se traslada codón tras codón en sentido 5'→3' a lo largo del ARNm, a medida que se procesa cada codón se “traduce” un aminoácido. Cuando el ribosoma llega a un codón de terminación cesa la traducción o formación del polipéptido, de modo que el grupo amino terminal (NH<sub>2</sub>) corresponde al extremo 5' del ARNm y el grupo carboxi terminal (COOH) al extremo 3'. Finalizado el proceso, ARNm, ribosoma y polipéptido se separan, liberándose al citoplasma la proteína (Jorde y cols., 1996; Watson y cols., 2016).

Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada  
La figura 14 sirve para ilustrar los procesos de Replicación, Transcripción y Traducción del ADN.



**Figura 14.** Teoría del Dogma central. Imagen que muestra la transmisión de información genética almacenada en la molécula de ADN o en los genes para formar las proteínas.

Como ya se ha mencionado el ADN se localiza dentro del núcleo celular, pero no se encuentra en forma de doble hélice como una hebra larga como se espera al ver las ilustraciones típicas del ADN, sino que se pliega alrededor de un núcleo proteico denominado histona formando un nucleosoma. Alrededor de 150 bases de ADN se enrollan en cada histona que se separa de la siguiente por 20-60 bases, y así sucesivamente. Los nucleosomas, se organizan en solenoides que a su vez se organizan en asas de cromatina. Estos bloques de proteínas forman los cromosomas, que son ADN compactado. Finalmente, cada célula contiene 23 moléculas de ADN o cromosomas que contienen toda la información genética. Pero el ADN no se encuentra ni en forma de cromosoma ni de cadena lineal, sino en una forma intermedia que es la cromatina, que en función de su compactación se divide en: heterocromatina constitutiva (que tiene un papel estructural y nunca se despliega) o Eucromatina o heterocromatina facultativa (que se despliega y repliega en función de las demandas celulares).



**Figura 15.** Mecanismo de compactación del ADN en un cromosoma mitótico. Para ello aproximadamente 146 pb de ADN se enrollan alrededor de un nucleosoma. A continuación, se forma la estructura de cuentas de collar para dar lugar a los selenoides que finalmente se empaquetan durante la mitosis en lo que conocemos como cromosoma mitótico.

### 2.4.3. Genética y Periodontitis

La periodontitis es una patología multifactorial. Existe un estímulo que es la infección bacteriana, normalmente por bacterias gram negativas anaerobias (Socransky y Haffajee, 1998). Pero en algunos pacientes, la periodontitis presenta una afectación moderada y en otros severa. Además, unos pacientes responden bien al tratamiento y otros no. Por ello parece claro que deben existir factores de riesgo, como los ambientales (como el hábito tabáquico, el estrés...) y una respuesta inmuno-inflamatoria variable por parte del hospedador que determina su susceptibilidad a la enfermedad. En base a esto, se ha intentado en múltiples investigaciones destacar el papel de algunos genes en esta respuesta.

Algunas condiciones “raras”, que se englobarían dentro del grupo de periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas, presentan una importante carga genética, que ocasiona unas condiciones que afectan, inhibiendo o alterando excesivamente la respuesta inmune y favoreciendo la aparición de enfermedades periodontales (Armitage, 1999). De este modo, la periodontitis aparece como una manifestación mas de la enfermedad.

En la periodontitis agresiva, se sospechaba que debía existir una respuesta descontrolada frente a la infección bacteriana. Mombelli y cols. (2002), concluyeron en su estudio que la presencia o ausencia de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (AA), *Porphyromonas gingivalis* (PG), *Prevotella intermedia* (PI), *Bacteroides forsythus* (BF) y *Campylobacter rectus* (CR) no se relacionaba con la aparición de una forma agresiva o crónica de periodontitis. Aunque sí que parecía existir una relación entre una variante altamente leucotóxica de AA y la periodontitis agresiva, en la mayoría de los pacientes no se encontraba dicha bacteria (Mombelli y cols., 2002). Por tanto, se descarta que simplemente la presencia o ausencia de determinadas bacterias por sí solas puedan ocasionar la pérdida de soporte. Se abre así, una vía amplia de investigación que busca estudiar cómo responde el organismo a esta infección en cada individuo, es decir, la susceptibilidad del hospedador, en la que la genética parece que pueda tener un papel protagonista.

Michalowicz y cols. en 1991, realizaron un estudio en 110 pares de gemelos adultos. En este estudio, los autores observaron que del 38-82% de la variabilidad en las medidas clínicas de la periodontitis podrían explicarse por factores genéticos (Michalowicz y cols., 1991). En 1997, Kornman y cols. concluyen en su estudio que una variante del gen que

codifica para la IL-1 $\beta$  se asociaría con altos niveles de IL-1 $\beta$ , y se relacionaría con una mayor severidad de periodontitis; se apunta por primera vez, que estos marcadores genéticos podrían ser de utilidad como indicadores de susceptibilidad a las enfermedades periodontales en adultos (Kornman y cols., 1997).

Si se tienen en cuenta los estudios mencionados y se intenta encuadrar los resultados dentro de la patogénesis periodontal, se debe empezar analizando los receptores celulares *Toll like Receptors* o *TLR*, que son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a bacterias (del inglés PAMPs, *Pathogen-associated molecular patterns*). Algunos estudios encuentran que existe evidencia que apoya la asociación entre la presencia de determinados polimorfismos en TLR4 y el riesgo de enfermedad periodontal crónica (Ozturk y Vieira, 2009; Han y cols., 2015).

Una vez reconocidos estos patrones y cómo se ha explicado en apartados anteriores, se produce una cascada inflamatoria con síntesis y liberación de citocinas proinflamatorias que ocasionaran cambios y destrucción a nivel tisular. Si se revisa la literatura al respecto, se pueden encontrar diversos estudios que intentan relacionar la presencia de polimorfismos en genes que codifican para IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL6, IL-8, IL10, TNF- $\alpha$ , MMP1, receptor de Vitamina D, Receptor Fc gamma IIA entre otros (Chen y cols., 2015; Song y cols., 2013; Nikolopoulos y cols., 2008; Karinbux y cols., 2012; Chen y cols., 2012; Chapple y cols., 2017). De todas estas moléculas proinflamatorias, los polimorfismos en IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , son los más estudiados y muestran asociación con la susceptibilidad a la periodontitis (Kornman y cols., 1997; Nikolopoulos y cols., 2008; Karinbux y cols., 2012). Se desarrolló un test de susceptibilidad genética que detectaba la presencia de polimorfismos en genes que codifican para IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . De modo que, si ambos polimorfismos estaban presentes, se consideraba al paciente genotipo-positivo con riesgo para desarrollar periodontitis crónica severa, y se presuponía que, ante el estímulo bacteriano, estos pacientes presentarían una hipersecreción de IL-1 $\beta$ . Sin embargo, cuando se intentó valorar la habilidad de este test para detectar verdaderamente el riesgo de periodontitis, se vio que existía cierta ambigüedad. Los resultados apuntaron que no eran una herramienta útil de diagnóstico o medición de riesgo, ya que la periodontitis se presentaba sin estar presente el genotipo; e igualmente, el genotipo podía estar presente y no desarrollarse periodontitis (Greenstein y Hart, 2002).

Aunque parece claro que la genética debe ser importante en la patogénesis periodontal, múltiples estudios fallan en demostrar esta asociación. Zeng y cols. (2015), encontraron en su meta-análisis que no existe asociación entre presentar polimorfismo de



Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada IL-1 $\beta$  y el riesgo de desarrollar periodontitis crónica. Otros meta-análisis tampoco encuentran relación de polimorfismos en TLR4 y MMP9 y periodontitis (Song y cols., 2013). Chatzopoulos y cols. en 2016 en su meta-análisis concluyeron que no hay diferencias en las medidas clínicas periodontales (sangrado al sondaje, nivel clínico de inserción, y profundidad de sondaje) al comparar pacientes periodontales con distintos genotipos para IL-1 (Chatzopoulos y cols., 2016).

Tomando en consideración todos los resultados de los meta-análisis y estudios mencionados anteriormente, no existen hoy en día, variantes genéticas que claramente expliquen la susceptibilidad o progresión de las enfermedades periodontales. Además, la gran heterogeneidad entre estudios hace difícil llegar a conclusiones sólidas (Nibali y cols., 2017). Como se ha descrito anteriormente, el estudio de Michalowicz y cols. con 110 pares de gemelos adultos en el que se establecía que entre 38-82% de la variabilidad en las medidas clínicas de la periodontitis podían explicarse por factores genéticos, hace pensar en otros mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la periodontitis (Michalowicz y cols., 1991). Muchas de estas incongruencias en los estudios quizás puedan aclararse gracias a los mecanismos epigenéticos. En otras palabras, los estudios sobre factores epigenéticos podrían aportar más información para aclarar estas incoherencias que aparecen en los estudios genéticos.

## **2.5. Epigenética**

En este último apartado de la introducción se revisará de forma breve el concepto y los principales mecanismos epigenéticos, y se analizarán algunas de las potenciales aplicaciones que este campo de la epigenética podría tener en el ámbito de la odontología y más concretamente de la periodoncia. Se finalizará el apartado con una revisión sistemática de la literatura que analizó los estudios que investigaban la relación entre periodontitis y epigenética.

### **2.5.1. Concepto y mecanismos epigenéticos**

El proceso de transmisión y descodificación de la información genética contenida en el ADN de algunos genes se realiza continuamente, es lo que se denomina genes de expresión constitutiva. En otros genes, la descodificación de la información se produce ante determinadas demandas celulares, y los reguladores que permiten que se produzca esta descodificación son los factores de transcripción. Un ejemplo de estos factores de

transcripción es el *nuclear factor kappa-beta* o *NF- $\kappa$ B*, que se activa cuando se pone en marcha el proceso inflamatorio. Ante un estímulo infeccioso, *NF- $\kappa$ B* entra en el núcleo celular y activa diversos genes que producirán moléculas relacionadas con el proceso inflamatorio. Pero estos factores de transcripción no se unen a cualquier región del ADN, sino que se unen a regiones de inicio de los genes (Stenvinkel y cols., 2007).

Como se pensaba, entre regiones de inicio de los genes, existen múltiples nucleótidos que no codifican información genética. Durante años, a estas regiones se les denominó “*ADN basura*”, pero nada más lejos de la realidad, ya que posteriormente se supo que estas regiones no codificantes son cruciales para separar regiones génicas y establecer regiones reguladoras en la transmisión y descodificación de la información genética. En esta regulación de la expresión genética adquiere un gran protagonismo la epigenética.

Se podría definir terminológicamente epigenética como “por encima de la genética”. En el año 1942, Waddington define epigenética como “*la rama de la biología que estudia la interacción causal entre los genes y sus productos, que dan lugar al fenotipo*”. Conceptualmente, esta definición ha ido transformándose con los años y recientemente en 2010, el *NIH Roadmap Epigenomics Project* definió la epigenética como “*los cambios heredables en la expresión y actividad genética (en la progenie celular o de individuos), así como alteraciones estables y no necesariamente heredables en el potencial transcripcional de una célula*” (Bernstein y cols., 2010; García-Gimenez, 2016).

El epigenoma humano es dinámico y responde a distintos estímulos internos y externos permitiendo la adaptación a las distintas necesidades celulares. En esta adaptación es crucial la expresión de determinados genes, y aquí es donde la epigenética presenta un papel importante para producir cambios reversibles, modulando la expresión genética sin producir cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN. Estos cambios epigenéticos pueden contribuir potencialmente a un estado de salud o dar lugar a una enfermedad (García-Gimenez, 2016).

Los mecanismos más estudiados de regulación epigenética y control de la estructura de la cromatina son tres: la metilación del ADN, las modificaciones post-traduccionales de las histonas y los ARN no codificantes, entre ellos los microARNs (miARNs) (García-Gimenez, 2016).

A continuación, se describen brevemente los aspectos más característicos de estos tres mecanismos epigenéticos.

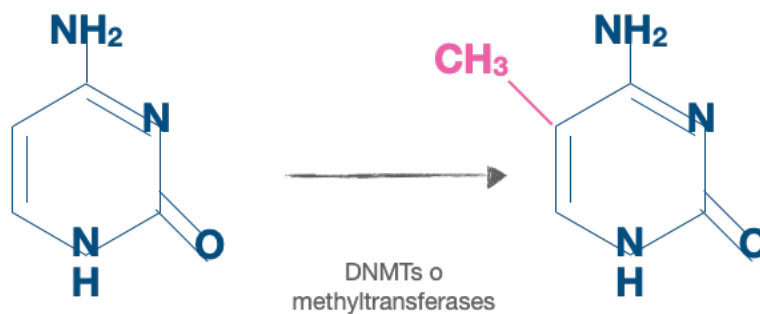
### 2.5.1.1. Metilación del ADN

La metilación del ADN se produce por adición de un grupo metilo al extremo 5' del anillo de pirimidina de la base nucleica citosina (C). Esta modificación supone una zona de reconocimiento para la unión proteica sin cambiar la secuencia de ADN. Las DNMTs o *DNA (cytosine-5-) methyltransferases*, son las encargadas de incorporar el grupo metilo a la citosina utilizando para ello la molécula *S-adenosylmetionina* como sustrato (Stenvinkel y cols., 2007).

Los "dinucleótidos CpG metilados" no se distribuyen de forma aleatoria a lo largo del genoma humano, sino que se localizan en regiones ricas en CpG, las islas CpG. Estas se sitúan en muchas regiones promotoras de los genes. Algunos de los factores transcripcionales de los que se ha hablado anteriormente solo son capaces de interaccionar con secuencias de ADN no metiladas, y por ello, la metilación de la citosina evita esta interacción (Clark y cols., 1997).

Es decir, la hipermetilación lleva a una menor transcripción o incluso al silenciamiento de algunos genes. Por otro lado, un defecto en la metilación o una hipometilación del ADN, resulta en una activación epigenética que lleva a la activación de la transcripción de genes (Clark y cols., 1997; Ting y cols., 2006; Oliveira y cols., 2009).

La alteración en la metilación del ADN se ha asociado con la inestabilidad del genoma, con la alteración en la conformación de la cromatina y con la fragilidad de los cromosomas (García-Gimenez, 2016). Se ha relacionado este estado de metilación aberrante con cáncer oral (Kato y cols., 2006) y con diversos procesos inflamatorios como la gastritis y la enfermedad renal crónica (Kang y cols., 2003b; Stenvinkel y cols., 2007).



**Figura 16.** Mecanismo de metilación y desmetilación de la base citosina en su C5 en el proceso de metilación del ADN.

### 2.5.1.2. Modificación post-traducciona de las histonas

En el apartado anterior se ha recordado como el ADN se pliega alrededor de unas proteínas nucleares denominadas histonas, formando la estructura básica de la cromatina que son los nucleosomas, que constituyen las unidades fundamentales de los cromosomas. Las histonas se agrupan formando un octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4). Estas histonas exponen aminoácidos cargados positivamente que al reaccionar con moléculas fosfato del ADN con carga negativa permiten el plegamiento (Kornberg, 1977; Luger y cols., 1997).

Las histonas pueden sufrir modificaciones químicas que cambiarán el estado de la cromatina y la expresión génica. Esto llevará al cambio en la estructura del nucleosoma y la extensión o propagación a diferentes regiones del genoma. Se ha observado que estas modificaciones postraduccionales se alteran en una gran variedad de enfermedades como el cáncer, síndromes neurológicos y sepsis. (Zeidler y cols., 2003; Chi y cols., 2010; Gray, 2011).

El papel importante de estas histonas en las regiones reguladoras de los genes hace que se consideren como herramientas útiles en el diagnóstico de enfermedades. Además, las histonas pueden encontrarse en diferentes fluidos como la sangre, el suero y el plasma. Por ello se las ha propuesto como biomarcadores de daño tisular, inflamación y apoptosis celular (Xu y cols., 2009; García-Gimenez, 2016).

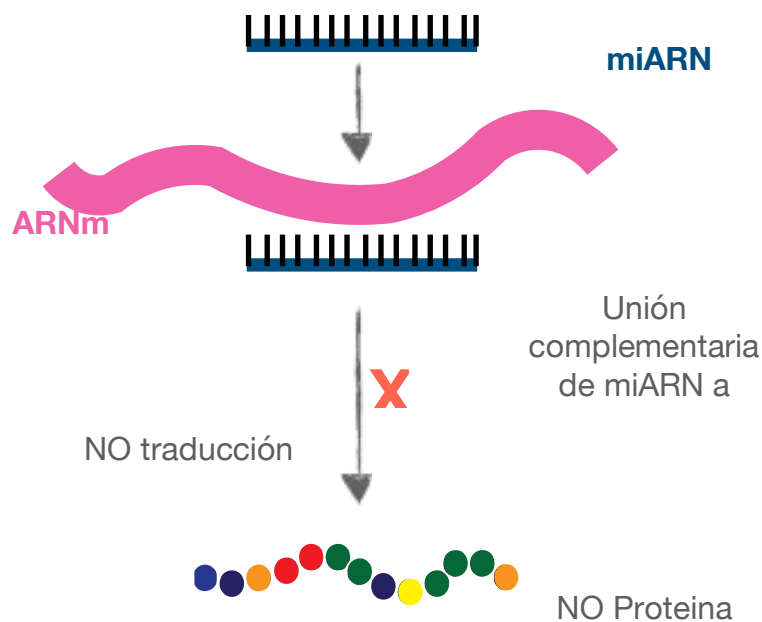
### 2.5.1.3. ARNs no codificantes

En el genoma humano solo existe un pequeño número de genes que codifican proteínas. Años atrás, se creía que parte del ADN no tenía función alguna y se le denominaba ADN basura. Más tarde se pudo demostrar que parte de estas regiones del genoma presentaban un papel muy activo en la regulación de la transcripción genética en gran variedad de procesos biológicos.

Solo el 2% de los ARNs codifican para la síntesis proteica. Una gran proporción de transcriptoma humano son los ARNsnc o ARNs no codificantes. Estos están constituidos por más de 200 nucleótidos. Sus funciones son heterogéneas con un alto potencial para regular la expresión genética (Storz, 2002; Lu y cols., 2005). Dentro de estos *ARNsnc*, se encuentran los *microARN* o *miARNs* y los *ARN no codificantes de cadena larga (long non coding ARN)*.

En el citoplasma, estos ARNsc se unen y bloquean ARNm actuando como “esponjas de ARNm” y evitando la expresión del ARNm (García-Gimenez, 2016). Es evidente, que esta compleja interacción ya deja ver que la regulación genética es un intrincado proceso en el que participan múltiples moléculas de ARN que tienen correlación entre sí.

Los miARNs son un grupo de ARN no codificante compuestos por aproximadamente 17-25 nucleótidos. Se han identificado más de 2000 miARNs en el genoma humano (Ambros, 2004; Bartel, 2004). Estos miARNs son capaces de controlar o regular la expresión de diferentes genes. Es decir, se unen post-transcripcionalmente a secuencias complementarias de ARNm, normalmente a la región 3' UTR o “3' untranslated region”, resultando normalmente en la silenciación del gen o represión del inicio de la translación y síntesis proteica (Xie y cols., 2011; Stoecklin-Wasmer y cols., 2012). Se ha visto que estos miARNs no codificantes participan en múltiples procesos biológicos como, el desarrollo, diferenciación y apoptosis celular, procesos inflamatorios, crecimiento tumoral, etc. (He y Hannon, 2004; García-Gimenez, 2016). Para la supresión de la expresión génica solo se necesita la unión de unos 6 pares de bases, por lo que un solo miARN puede ser un potencial controlador de la expresión de cientos de genes diana simultáneamente, teniendo un notable impacto en la síntesis proteica (Thomson y cols., 2011; Baek y cols., 2008).



**Figura 17.** Regulación de expresión génica por parte de miARNs.

Algunas de las características de los ARNnc les confieren un alto valor como biomarcadores diagnósticos. Presentan alta estabilidad y gran resistencia a la degradación (García-Giménez y cols., 2017). En procesos como el cáncer se han podido determinar sobreexpresiones de ARNnc (Volinia y cols., 2006). Una alteración en la regulación de la transcripción de los genes puede llevar a un perfil de desregulación de ARN no codificante, llevando a condiciones patológicas o de enfermedad. Por ello, podría ser muy interesante conocer los niveles de miARNs en humanos (García-Giménez y cols., 2017).

Se ha visto que la expresión de miARNs afecta a la patobiología de diversas enfermedades como el cáncer (Sumazin y cols., 2011) y diversas enfermedades inflamatorias como el lupus y la artritis reumatoide (Dai y cols., 2007; Nakasa y cols., 2008).

Es evidente que la regulación epigenética es extremadamente compleja. La información epigenética puede propagarse a través de las múltiples divisiones celulares. Se sabe que el estilo de vida, el entorno, la inflamación crónica y el estado nutricional, inducen cambios a nivel epigenético que a lo largo de la vida pueden ocasionar una desregulación epigenética que pueda llevar al desarrollo de enfermedad. La metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de las histonas y los ARN no codificantes presentan implicación en algunas enfermedades como el cáncer, las enfermedades infecciosas, la infertilidad y desordenes metabólicos y neurodegenerativos. Por tanto, la identificación de estos cambios epigenéticos puede ser de gran ayuda en el diagnóstico de estados de salud y enfermedad en el ser humano (García-Gimenez, 2016).

### **2.5.2. Biomarcadores epigenéticos**

Un biomarcador, se encuentra en los tejidos o en los fluidos del organismo, debe proporcionar información sobre la presencia o ausencia de enfermedad, el pronóstico, respuesta al tratamiento y riesgo futuro de progresión de enfermedad (García-Gimenez, 2016; García-Giménez y cols., 2017). Además, los biomarcadores deben ser estables, específicos y sensibles. La gran ventaja que presentan los marcadores epigenéticos frente a los marcadores genéticos es su dinamismo, ya que éstos cambian en función de la evolución de la enfermedad y de los cambios en el entorno celular, mientras que los marcadores genéticos son estáticos (García-Gimenez, 2016).

Según el *National Institutes of health* (NIH, USA), un “biomarcador es una característica que puede medirse objetivamente y evaluarse como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos, o respuestas farmacológicas ante

Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada una intervención terapéutica” (Grant, 2012). Se podrían clasificar en distintos tipos de biomarcadores según propone Bensalah y cols. en 2007:

- Biomarcadores de detección temprana de la enfermedad;
- Biomarcadores de diagnóstico de presencia o ausencia de enfermedad;
- Biomarcadores de pronóstico de enfermedad y clasificación de riesgo alto de recurrencia de enfermedad;
- Biomarcadores de predicción de respuesta al tratamiento;
- Biomarcadores de identificación de respuesta satisfactoria del paciente al tratamiento.

Además, un biomarcador debe de ser objetivo, reproducible, fácil de usar, económico, y con mayor especificidad, sensibilidad y eficacia diagnóstica que los tests existentes (Grant, 2012).

Los distintos mecanismos de regulación epigenética se han relacionado con enfermedades infecciosas y con procesos inflamatorios crónicos. En consecuencia, puede ser lógico pensar que en la periodontitis, estos mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión génica puedan dar respuesta a algunas de las incongruencias que la evidencia científica aún hoy en día no ha sido capaz de responder, por ejemplo, por qué algunos pacientes no responden al tratamiento periodontal, o por qué el carácter agresivo de la destrucción periodontal en algunos individuos.

Además, factores medioambientales o del entorno, el estilo de vida, los hábitos dietéticos, el hábito tabáquico, el estrés, etc. también producen cambios epigenéticos que pueden llevar a esta desregulación de la expresión génica, que podría alterar la respuesta inflamatoria de forma desmesurada en un momento dado.

La epigenética puede resolver algunas limitaciones del estudio de la genética y la genómica, proporcionando nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas para controlar la función del genoma. Los marcadores epigenéticos podrían servir como herramientas útiles en el estudio fisiopatológico de algunas enfermedades y predecir así la evolución de la enfermedad y monitorizar la respuesta al tratamiento (García-Gimenez, 2016). Por sus características, en las enfermedades periodontales estos marcadores son un campo de estudio prometedor.

### **2.5.3. Revisión sistemática: Epigenética y periodoncia**

Las características de los biomarcadores epigenéticos en cuanto a su estabilidad, sensibilidad y especificidad, así como el potencial que ofrecen los mecanismos

epigenéticos para la comprensión de la fisiopatología de distintas enfermedades justificaron plantear la posible utilidad de estos biomarcadores epigenéticos como herramientas diagnósticas y terapéuticas en enfermedades infecciosas-inflamatorias de carácter crónico.

En la periodontitis, existe una interacción entre la infección y los cambios producidos en los tejidos por la desregulación de la respuesta inflamatoria, que lleva al establecimiento de un entorno que a su vez favorece la perpetuación del estímulo inflamatorio.

Los estudios de meta-análisis encuentran relación entre algunos polimorfismos de genes que codifican para proteínas pro-inflamatorias y la periodontitis. Sin embargo, fallan al asociar una variante genética con la seguridad de desarrollar enfermedades periodontales. Por tanto, hoy en día no existen biomarcadores genéticos capaces de predecir claramente el riesgo de inicio o progresión de periodontitis. En este sentido, los mecanismos epigenéticos podrían aportar nueva información relevante.

Son pocas las investigaciones que se pueden encontrar en la literatura sobre la posible relación de estos cambios epigenéticos con la periodontitis. No existía ninguna revisión sistemática o meta-análisis que analizase de forma reglada los distintos estudios que investigan esta relación. Por este motivo, se realizó una revisión sistemática para detectar, resumir y analizar todas las publicaciones de investigaciones en humanos que estudiaran esta posible implicación de los factores epigenéticos en la patogénesis periodontal y así, poder valorar su posible utilización como biomarcadores en la periodontitis.

Esta revisión sistemática se encuentra publicada en la revista Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía bucal (Almiñana y cols., 2019).

Para dar respuesta al objetivo planteado se realizó una búsqueda sistemática de acuerdo con los criterios PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Metaanalysis*).

### **2.5.3.1. Pregunta de revisión**

La pregunta PECO (Population, Exposition, Comparison, Outcome) que se formuló fue: Población- Humanos; Exposición- alteraciones epigenéticas; Comparación- sin enfermedades periodontales o sanos; Resultado- enfermedades periodontales. De forma



Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada que la pregunta a responder podría ser: ¿Existe relación entre los niveles de biomarcadores epigenéticos y el riesgo de presentar enfermedades periodontales en humanos?

Esta revisión se registró previamente en la base de datos PRISMA (PROSPERO) con el número de referencia: CRD42017063924

### **2.5.3.2. Criterios de inclusión y exclusión**

Los criterios de inclusión fueron:

- Estudios de casos y controles
- Estudios de Cohortes
- Se incluyeron estudios tanto prospectivos como retrospectivos

En cuanto a los criterios de exclusión, quedaron descartados de la búsqueda:

- Casos clínicos y series de casos
- Revisiones de la literatura
- Editoriales
- Estudios en animales
- Estudios con experimentación *in vitro*

### **2.5.3.3. Fuentes de Información**

Para identificar todos los estudios relevantes que pudiesen responder a la pregunta PECO planteada, se realizó una rigurosa búsqueda electrónica en las bases de datos Pubmed, Embase, Scopus, Scielo, Cochrane y WOS. Con el objetivo de no dejar fuera ningún artículo que pudiese ser relevante, no se aplicaron filtros de lenguaje para los artículos.

La búsqueda se realizó sin límite temporal el 17 de abril de 2017. Se realizó una actualización de la búsqueda en marzo de 2019.

### **2.5.3.4. Estrategia de búsqueda**

Para tratar de encontrar los estudios que analizaran la relación entre los distintos mecanismos epigenéticos y las enfermedades periodontales, se emplearon términos para

la búsqueda que englobaran la totalidad de enfermedades periodontales y la totalidad de mecanismos epigenéticos.

Se empleó la siguiente estrategia de búsqueda:

("periodontal disease" OR periodontitis OR "periodontal infection" OR periodont\*) AND (microRNAs OR microRNA OR "DNA methylation" OR "histone modification" OR epigenetics OR epigenomics OR "epigenetic biomarker" OR "epigenomic biomarker" OR epigen\*).

Para esta estrategia, se usaron tanto términos MeSH como no MeSH. Se tuvieron en cuenta las diferentes combinaciones y diferencias en el modo de escritura de las palabras para las diferentes bases de datos. La búsqueda electrónica se combinó con una búsqueda manual realizada a partir de las referencias presentes en los artículos elegidos, con el objetivo de añadir estudios relevantes que no se hubiesen encontrado durante la primera búsqueda.

#### **2.5.3.5. Proceso de selección de estudios**

El proceso de selección de los estudios encontrados con la búsqueda se llevó a cabo por dos revisores (PA y MB), que evaluaron los títulos y el resumen de todos los artículos seleccionados. Previamente, se analizaron los duplicados en las tres bases de datos. En caso de no existir acuerdo, se consultó a un tercer revisor (AL).

En aquellos casos en los que la lectura de título y abstract era insuficiente para tomar una conclusión sobre la inclusión o no del artículo, los revisores leyeron el texto completo antes de tomar una decisión que lo excluyera.

Una vez finalizado este primer cribado, se leyeron todos los artículos seleccionados a texto completo, y en caso de rechazar alguno, se anotaron las razones de su exclusión.

#### **2.5.3.6. Proceso de extracción de datos y lista de variables**

De cada uno de los artículos se extrajeron los siguientes datos:

- Autor y año de publicación
- Tipo de estudio
- Tamaño de la muestra, modo de selección de la muestra, número de abandonos y porcentaje de sujetos por género
- Tipo de enfermedad periodontal analizada: periodontitis crónica o periodontitis agresiva

- Tipo de marcador epigenético analizado: metilación de ADN, modificación de histonas o miARNs
- Resultados
- Calidad del artículo

### **2.5.3.7. Medición de la calidad de los estudios**

La calidad de los estudios elegidos se evaluó mediante la Newcastle-Ottawa Quality Assessment Scale (NOS) para estudios observacionales de casos y controles. Esta escala presenta ocho ítems que especifican aspectos de la calidad metodológica de los estudios (Wells y cols., 2017).

En esta escala de calidad metodológica, aparecen 3 apartados. El primero es el apartado de selección, que evalúa la selección de los casos y de los controles, así como su correcta definición, pudiendo obtener una puntuación máxima de cuatro puntos. El segundo de los puntos es la comparabilidad, que evalúa cómo son de homogéneos los dos grupos. Éste es el único ítem que puede recibir dos puntos. El último de los puntos es el de exposición, que trata de determinar cómo se ha medido la exposición en ambos grupos, así como la ratio de abandono o no respuesta, pudiendo obtenerse un máximo de 3 puntos. En resumen, cada uno de los estudios sólo podía recibir un punto para cada ítem, con la excepción del ítem comparabilidad, que podía recibir 2 puntos. Por tanto, cada artículo podía recibir un máximo de nueve puntos. La calidad de los estudios se analizó de forma independiente por los dos revisores. Nuevamente, si existía desacuerdo en algún artículo, se llegaba al consenso gracias a la opinión de un tercer revisor.

### **2.5.3.8. Resultados de la revisión sistemática**

#### **Selección de estudios y diagrama de flujo PRISMA**

Una vez realizada la búsqueda como se ha apuntado en el apartado anterior, siguiendo el protocolo registrado en PROSPERO, y sin aplicar límite temporal con el objetivo de no excluir ningún artículo relevante, se encontraron los resultados que se exponen a continuación.

La estrategia de búsqueda encontró: 448 artículos en Pubmed, 631 en Embase y 363 en Scopus, 415 en WOS, 3 en Scielo y 0 en cochrane. Por búsqueda manual se

## Revisión bibliográfica

obtuvieron tres artículos. En total 1863 artículos que tras eliminar los duplicados en las tres bases quedaron en 879 artículos en total.

El screening inicial al leer título y abstract descartó 808 artículos. La mayoría de éstos se eliminaron por no ser pertinentes con la pregunta de estudio (n=469). Otras causas para su exclusión fueron: revisiones de la literatura (n=67), analizar la relación de mecanismos epigenéticos con otras patologías distintas a las enfermedades periodontales (n=130); y estudios in vitro donde se experimentaba con cultivo celular de pacientes que no eran periodontales o de células inmortalizadas (n=142).

71 artículos cumplían finalmente con los criterios de inclusión expuestos anteriormente. Una vez realizada la lectura a texto completo, se excluyeron 35 artículos. Las causas de exclusión fueron: estudios con experimentación in vitro a partir de sujetos sanos o células inmortalizadas (n=13), no analizar mecanismos epigenéticos (n=8), no estudiar la relación con las enfermedades periodontales (n=6), ser revisión de literatura (n=1), estudio en animales (n=1) y guía de laboratorio para el análisis de muestras (n=1). Se excluyeron cinco estudios por no presentar un grupo control sano para la comparación (n=5).

Por tanto, finalmente fueron 36 artículos los que se analizaron detalladamente, realizando la medición de la calidad de cada estudio según la Newcastle Ottawa Scale. En el diagrama de flujo PRISMA (Figura 18) se resume el proceso de selección de los artículos.

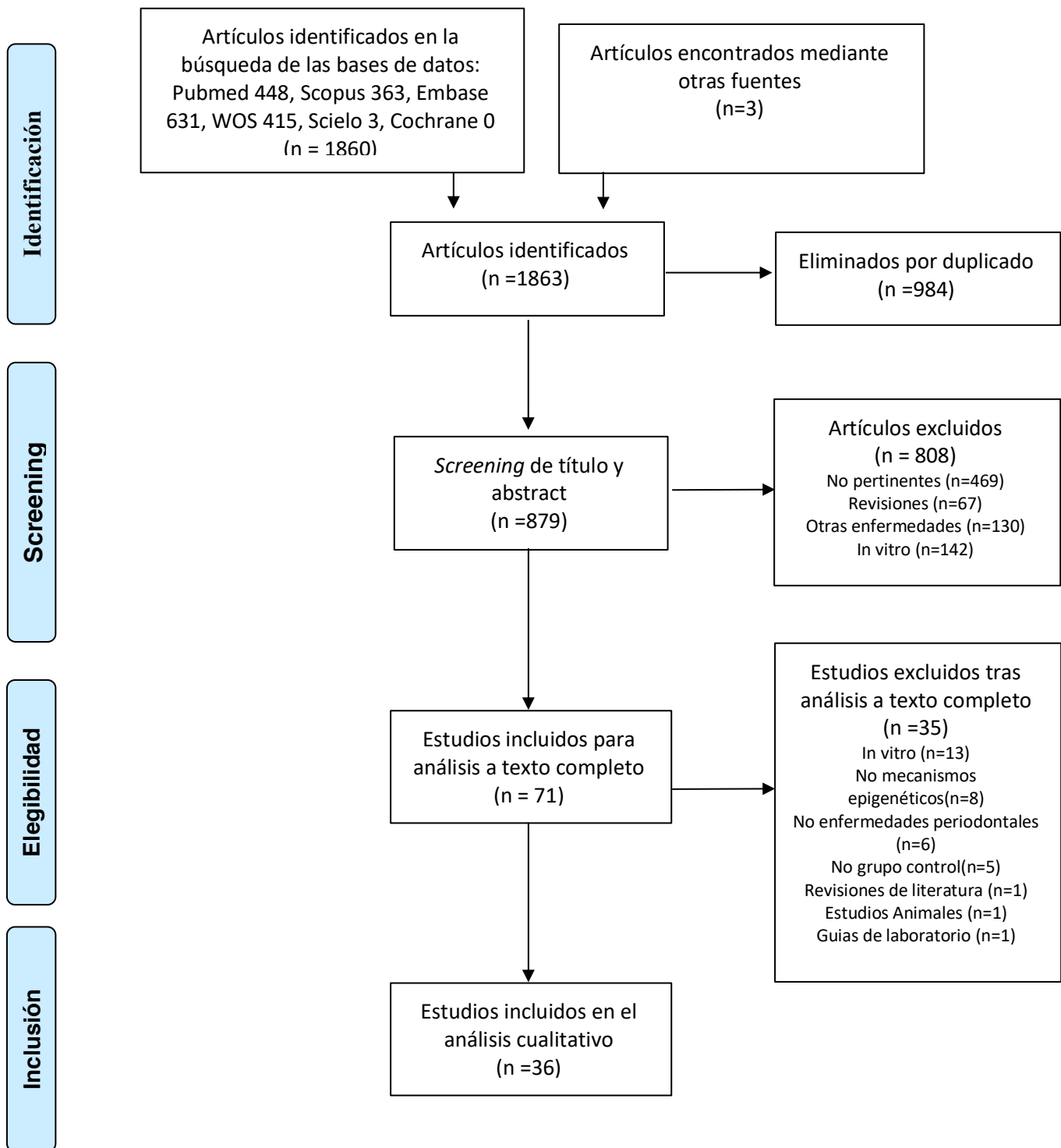


Figura 18. Diagrama de flujo PRISMA.

**Características de los estudios incluidos**

Todos los artículos seleccionados para la síntesis cualitativa fueron estudios de casos y controles.

El tamaño muestral de los estudios variaba entre 6 y 398 individuos.

En función del mecanismo epigenético analizado, se hallaron veinte estudios que analizaban la metilación del ADN, dieciseis analizaban los miARNs. No se encontró ningún estudio que analizase las modificaciones post-transcripcionales de histonas en humanos, sin experimentación *in vitro*.

La tabla 3 muestra las características de los artículos aceptados y los resultados.

<b>Tabla 3. Características y Resultados de los estudios aceptados.</b>					
<b>Autor (Año) Tipo de Estudio</b>	<b>N (Casos/Contr oles) edad media ± SD</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>Mecanismo Epigenético</b>	<b>Enfermedad Periodontal</b>	<b>Resultados</b>
<b>Bagavad y cols., (2019) (Caso-Control)</b>	132 (controles=66, cases=66) MA: controles 48±4,4; casos 43,2 ±1,9	Muestra Sanguínea	miARNs	Periodontitis Crónica	miR-146 Sobre- expresado en PC
<b>Naqvi y cols., (2019) (Caso-Control)</b>	28 (controls=14, cases= 14) MA: ND	Biopsia Gingival	miARNs	Periodontitis Crónica	miR-150 sobre- expresado en PC
<b>Yoneda y cols., (2019) (Caso-Control)</b>	60 (controles= 30, casos=30) MA: controles 65±13,2; casos 67±11,7.	Muestra Sanguínea	miARNs	Periodontitis Crónica	miR-664, miR- 501, miR-21 Sobre-expresado en PC
<b>Micó y cols., (2018) (caso-control)</b>	18 (controles=9, casos=9) MA: controles 33,3±12,05; casos 50,44±8,09	Fluido Crevicular Gingival	miARNs	Periodontitis Crónica	miR-1226 infra- regulado en PC.

<b>Venugopal y cols., (2018) (Caso-Control)</b>	200 (controles=100 , casos=100) MA: Controles 40,4±8,5; casos 48,4±11,6	Biopsia Gingival	miARNs	Periodontitis Crónica	Let/a and miR-21 sobre-expresado en PC.
<b>Li y cols., (2018) (Caso-Control)</b>	32 (controles=16, casos=16) MA: controles 41,25±4,89; casos 38±5,68)	Biopsia Gingival	miARNs	Periodontitis Crónica	miR-144 sobre- expresado en PC.
<b>Ghotloo y cols., (2018) (Caso-Control)</b>	28 (controles=10, casos=18) MA: controles 32±12; casos 27±13	Biopsia Gingival	miARNs	Aggressive Periodontitis	miR-146 Sobre-expresado en AP. Expresión disminuida de TNF-a, IL1b, IL6 in AP.
<b>Radovic y cols., (2018) (Case-Control)</b>	96 (controles=48; casos=48) MA: controles 33,4±ND casos 54,7±ND	Fluido Crevicular Gingival	miARNs	Periodontitis Crónica	miR-146 y miR- 155 sobre- expresados en PC.
<b>Asa'ad ey cols., (2017) (Case-Control)</b>	20 (controles=10, Casos=10) MA: controles 53,3±12,3; casos 46,6±10	Biopsia Gingival	Metilación de ADN (TNF-a, IFN- g, COX2)	Periodontitis Crónica	Hipometilación TNF-a, IFN-g, COX 2 en controles
<b>Saito y cols., (2017) (Caso-Control)</b>	20 (controles=11 casos=9 (2 AP, 7 CP)) ND	Fluido Crevicular Gingival	miARNs	Periodontitis Crónica y Periodontitis Agresiva	miR-332, miR- 223, miR-203, miR-205. (19 miRNAs sobre- expresados y 21 infra-expresado)
<b>Kojima y cols., (2016) (Caso-Control)</b>	69 (controles=30, casos =39) MA: controles 63,3±1,8; casos 64,4±1,5)	Muestra Sanguínea	Metilación de ADN (TNF-a gen promoter region)	Periodontitis Crónica	Hipermetilación TNF- $\alpha$ en P.
<b>Kobayashi y cols., (2016) (Caso-Control)</b>	45 (controles=65, 4±22; casos 64,3 ±1,4.	Biopsia Gingival y Muestra Sanguínea	Metilación de ADN (IL6 gen promoter region)	Periodontitis Crónica	Sin diferencias entre grupos

<b>Schulz y cols., (2016) (caso-control)</b>	25 (controles=10; casos= 15) MA: controles 36,9±17,5; casos 41.4±10,5	Biopsia Gingival	Metilación de ADN (inflammation genes, CCL25 and IL17)	Periodontitis Agresiva	Hipometilación en genes inflamatorios, CCL25, IL17 y IL13
<b>Planello y cols., (2016) (caso-control)</b>	42 (controles=23; casos=19) MA: ND	Biopsia Gingival	Metilación de ADN (SOCS1)	Periodontitis Crónica	Hipermetilación de SOCS1 en PC
<b>Motedayyen y cols., (2015) (caso-control)</b>	30 (controles=10; casos=20) MA: controles 45±ND; casos 45,5±ND	Biopsia Gingival	miARNs	Periodontitis Crónica	32,6 veces más expression de miARN 146a en PC (p<0,001)
<b>Wang y cols., (2014) (caso-control)</b>	290 (controles=180 , casos=110) MA: controles 45,6±2,4; casos 44,2±1,5	Muestra Sanguínea y Biopsia Gingival y tumoral	Metilación de ADN	Periodontitis Crónica	Hipermetilación de 14-3-3o en PC. No diferencias entre grupos de metilación deTIMP3 y GSTP1
<b>Ogata y cols., (2014) (caso-control)</b>	6 (controles=3; casos= 3) ND	Biopsia Gingival	miARNs	Periodontitis Crónica	miR-150, miR- 223 y miR-200b sobre- expresados en PC
<b>Baptista y cols., (2014) (caso-control)</b>	60 (controles=30, Casos=30) MA: controles 37,23±12,82 Casos: 29,20±5,60	Enjuague con 3% de Dextrosa	Metilación de ADN (SOCS1 and LINE1)	Periodontitis Agresiva	Hipermethylation of SOCS1 and LINE1
<b>de Souza y cols., (2014) (caso-control)</b>	23 (controles=11; casos=12) MA: controles 50,42 ±8,35; casos 50,63±7,89	Biopsia Gingival	Metilación de ADN (immunity genes)	Periodontitis Crónica	Hipometilación genes inmunitarios en PC. (p<2,2 <sup>-16</sup> )
<b>de Faria Amormino y cols., (2013) (caso-control)</b>	40 (controles=20; Casos=20) MA: controles 36,75±7,79; casos 36,75±7,79	Biopsia Gingival	Metilación de ADN (TLR2 promoter)	Periodontitis Crónica	hipermetilación TLR2 en PC y correlación positiva con profundidad de sondaje y células inflamatorias



Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada

de Camargo y cols., (2013) (caso-control)	20 (controles=10; casos=10) MA: 45,1±11,8	Biopsia Gingival	Metilación de ADN (DNMT1, DNMT3a, JMJD3, UTX)	Periodontitis Crónica	No diferencias en metilación entre grupos
Stefani y cols., (2013) (caso-control)	42 (controles=21, casos=21) MA: controles 28±ND; casos 41±ND.	Biopsia Gingival	Metilación de ADN (IL6 gen promoter region)	Periodontitis Crónica	No diferencias entre grupos en metilación de IL6
Zhang y cols., (2013) (caso-control)	46 (controles=17, PC=18, GE=11) MA: controles 40,9±13,5, PC 48,7 ±8,7, GE 36,8±9,7	Biopsia Gingival	Metilación de ADN (TNFa gen)	Gingivitis Experimental  Periodontitis Crónica	Hipermetilación de TNFaen PC
Kadkhodazadeh y cols., (2013) (caso-control)	197 (controles=84, PI=38, PC=75) MA: ND	Muestra Sanguínea	miARNs	Periodontitis Crónica y Periimplantitis	miR-146a y miR- 499 sobre- expresados en PC y PI
Ishida y cols., (2012) (Caso-Control)	60 (controles=30, casos=30) MA: controles 53,4±2,7; casos 62,3±1,5.	Muestra Sanguínea	DNA methylation (IL6 gen promoter region)	Periodontitis Crónica	hipometilación region promotora del gen IL6 en PC
Stoecklin-Wasmer y cols., (2012) (caso-control)	198 (controles=40, casos= 158) MA 44,5 ±ND	Biopsia Gingival	miARNs	Periodontitis Crónica	miR-203 aumentado en controles miRNA miR-451, miR- 223, miR-486-5p y miR-3917 aumentado en P.
Perri y cols., (2012) (caso-control)	24 (ND casos ND controles) MA 45 ±13,3.	Biopsia Gingival	miARNs	Periodontitis Crónica	miR-30e and miR-106b over- expressed in CP
Lee y cols., (2011) (caso-control)	ND ND	Biopsia Gingival	MiRNAs	Periodontitis Crónica	miR-181b, miR- miR-19b, miR- miR-23a, miR- 30a, let7a, miR- 301a aumentado en PC.

<b>Viana y cols., (2011) (caso-control)</b>	34 (controles=16; casos=18) MA: controles 29,5±ND casos 50±ND	Biopsia Gingival	Metilación de ADN (IFN-G y IL10)	Periodontitis Crónica	No diferencias entre grupos en la metilación de IFNg y IL10
<b>De Oliveira y cols., (2011) (caso-control)</b>	34 (Controles=11, CPS=11, CPNS=12. MA: Controles 39,8±15,5; CPS 45,7±7,4; CPNS 45,5±10,1	Biopsia Gingival	Metilación de ADN (TLR 2 and TLR4 gen)	Periodontitis Crónica	No diferencias en metilación de TLR2 y TLR4.
<b>Xie y cols., (2011) (caso-control)</b>	20 (Controles=10; casos=10) MA:Controles 36,5±ND, CP 40,6±ND	Biopsia Gingival	miARNs	Periodontitis Crónica	miR-155 aumentada en controles y miRNA 146 en PC. (p<0,05)
<b>Andia y cols., (2010) (caso-control)</b>	74 (controles=37; casos=37) MA: controles 28,08±6,39; casos 28,82 ±4,73	Enjuague 3% dextrosa	Metilación de ADN (IL8 gen)	Periodontitis Agresva	Hipometilación de IL8 en AP (p=0,012)
<b>Loo y cols., (2010) (case-control)</b>	218 (controles=108 ; casos: 110) MA: Controles 42,8 ±9,69; PC 42,9 ±9,71	Muestra Sanguínea + Biopsia Gingival	Metilación de ADN (CpG islands of E- Cadherin and Cox2 gens)	Periodontitis Crónica	Hipermetilación de COX2 y E- Cadherin (p<0,0001)
<b>Zhang y cols., (2010a) (caso-control)</b>	16 (casos=10; Controles =6) MA cases 45,8±7,4 controls: 44,2 ±15,6	Biopsia Gingival	Metilación de ADN PTGS2 promoter.	Periodontitis Crónica	Hipermethylation in CP(5,06 times higher than controls)
<b>Zhang y cols., (2010b) (caso-control)</b>	47 (Controles= 23, GE=12, PC=12) MA: Controles 40,8±0,6; EG 35,8±11,2; CP 47,2 ±7,4.	Biopsia Gingival	Metilación de ADN CpG of IFNG promoter.	Gingivitis Experimental  Periodontitis Crónica	Hipometilación y 1,96 veces más transcripción de ARNm IFNg en PC.

Oliveira y cols., (2009) (caso-control)	120 (CPNS=40 CPS=30 Controles=70) MA: Controles=46, 2±14,1; CPS: 47,03±6,49; CPNS: 44,9±9,17.	Biopsia Gingival+ enjuague 3% dextrosa	Metilación de ADN (IL 8 gen)	Periodontitis Crónica	Enjuague: Células epiteliales orales =100% de metilación en controles. Biopsia: sin diferencias
---	---	---	------------------------------------	--------------------------	---

MA: Edad Media; ND: No Datos; PC: Periodontitis Crónica; AP: Periodontitis Agresiva.; GE: Gingivitis experimental; PI: Periimplantitis; CPS: Fumadores Periodontitis Crónica; CPNS: No Fumadores Periodontitis Crónica.

### **Calidad de los estudios seleccionados**

La calidad de los veintiseis artículos observacionales de casos y controles analizados fue de moderada a alta de acuerdo con las puntuaciones obtenidas al aplicar la escala *Newcastle-Ottawa* para estudios de casos y controles (Tabla 4).

Tabla 4. Calidad de los estudios seleccionados según la Newcastle-Ottawa Scale.										
Autor (Año)	Selección				Comparabilidad		Exposición			Total Puntos
	1	2	3	4	5a	5b	6	7	8	
Bagavad y cols., (2019)	*	*	*	*	*		*	*		7
Naqvi y cols., (2019)	*	*	*	*	*		*	*		7
Yoneda y cols., (2019)	*	*	*	*			*	*		6
Micó y cols., (2018)	*	*	*	*			*	*		6
Venugopal y cols., (2018)	*	*	*	*	*		*	*		7
Li y cols., (2018)	*	*	*	*			*	*		6
Ghotloo y cols., (2018)	*	*	*	*			*	*		6
Radovic y cols., (2018)	*	*	*	*			*	*		6
Asa'ad y cols., (2017)	*	*	*	*	*	*	*	*		8
Saito y cols., (2017)	*	*	*	*			*	*		6
Kojimay cols., (2016)	*	*	*	*	*		*	*		7

Revisión bibliográfica

Kobayashi y cols., (2016)	*	*	*	*	*		*	*		7
Schulz y cols., (2016)	*	*	*	*	*		*	*		7
Planello y cols., (2016)		*			*		*	*		4
Motedayyen y cols., (2015)	*	*	*	*			*	*		6
Wang y cols., (2014)	*	*	*	*			*	*		6
Ogata y cols., (2014)	*	*	*				*	*		5
Baptista y cols., (2014)	*	*	*	*			*	*		6
de Souza y cols., (2014)	*	*	*	*	*		*	*		7
de Faria Amormino y cols., (2013)	*	*	*	*			*	*		6
de Camargo y cols., (2013)	*			*			*	*		4
Stefani y cols., (2013)	*	*	*	*			*	*		6
Zhang y cols., (2013)	*	*	*	*	*		*	*		7
Kadkhodazadeh y cols., (2013)	*	*	*	*			*	*		6
Ishida y cols., (2012)	*	*	*	*	*		*	*		7
Stoeklin-Wasmer y cols., (2012)	*		*	*	*		*	*		6
Perri y cols., (2012)	*	*	*	*			*	*		6
Lee y cols., (2011)	*	*	*	*			*	*		6
Viana y cols., (2011)	*	*	*	*			*	*		6
De Oliveira y cols., (2011)	*	*	*	*			*	*		6
Xie y cols., (2011)	*	*	*	*	*		*	*		7
Andia y cols., (2010)	*	*	*	*			*	*		6
Loo y cols., (2010)		*	*	*			*	*		4
Zhang y cols., (2010a)	*			*	*		*	*		4

Zhang y cols., (2010b)	*	*		*	*		*	*		6
Oliveira y cols., (2009)	*		*	*			*	*		5

*Criterios: (1) Definición correcta de los casos. (2) Representatividad de los casos. (3) Selección de los controles. (4) Definición de los controles. (5) Comparabilidad de casos y controles en base de diseño o análisis, (5a) para un factor(5b) para factores adicionales. (6) Comprobación de la exposición. (7) Mismo método de comprobación para casos y controles. (8) Ratio de no respuesta.*

### **Síntesis Cualitativa de los estudios seleccionados**

Esta revisión sistemática se realizó para estudiar la relación entre los mecanismos epigenéticos y la patología periodontal en humanos. Se analizaron los diferentes estudios publicados en la literatura con el objetivo de encontrar si existía diferencia en la expresión de estos marcadores epigenéticos en los tejidos afectados de periodontitis al compararlos con tejidos sanos, para poder así valorar su utilidad como biomarcadores.

Para disminuir el riesgo de sesgo se realizó la búsqueda en seis bases de datos y se añadió la búsqueda manual. La escala de calidad metodológica *Newcastle Ottawa Scale* dio a los estudios puntuaciones medio-altas.

Los datos obtenidos a partir de los estudios incluidos tras la búsqueda son datos de estudios en humanos obtenidos a partir de biopsia gingival la gran mayoría. Baptista y cols. (2014) y Oliveira y cols. (2009) obtenían células a partir de enjuague bucal, y Loo y cols. (2010); Kadkhodazadeh y cols. (2013) y Wang y cols. (2014) tomaban muestras sanguíneas.

Se excluyeron todos aquellos estudios en los que se realizaba experimentación in vitro, ya que los estudios in vitro no son adecuados para valorar la implicación de un factor dentro de una compleja red de relación multifactorial (Chen y cols., 2016).

A pesar de que existe mucha información respecto a la histopatología, biología molecular y genética en las enfermedades periodontales, son pocos los trabajos que estudian los mecanismos epigenéticos en la periodontitis. En el genoma humano hay un gran número de genes y de regiones promotoras de los genes, así como material genético no codificante, que hace que exista una gran complejidad y número de marcadores epigenéticos que a la vez interaccionan entre sí y se van adaptando de forma dinámica a las demandas funcionales celulares. Todo esto hace que cada estudio se centre en un determinado gen y, por tanto, es complicada la comparación de resultados entre ellos. No fue posible realizar un metanálisis de los datos de los diferentes estudios.

La metodología de análisis de los miARN y de la metilación del ADN fue similar, pero los genes estudiados en los diferentes artículos seleccionados diferían, lo cual no permitió la extracción de una única conclusión.

Respecto a la metilación del ADN, algunos trabajos encontraron un estado de hipometilación de la región promotora de genes que codifican para moléculas proinflamatorias como IL8 (Andia y cols., 2010), IL6 (Stefani y cols., 2013), IL10, IFN $\gamma$  (Zhang y cols., 2010b; Viana y cols., 2011) y CCL25, IL17 e IL13Ra1 (Schulz y cols., 2016). De Souza y cols. (2014) estudiaron el estado de metilación en pacientes periodontales y observaron un estado de hipometilación global para los genes inmuno-inflamatorios. Este estado hipometilado llevaría a una mayor expresión de estas moléculas proinflamatorias, lo que supondría una respuesta posiblemente exagerada frente a la infección periodontopatógena. Como se ha visto en muchos estudios que analizan estas moléculas inflamatorias en pacientes periodontales, sus niveles suelen encontrarse elevados siendo indicativos de actividad o progresión de enfermedad.

Otros trabajos no obtuvieron diferencias en los niveles de estas citocinas con pacientes sanos. Se ha sugerido que una vez perpetuado el estímulo inflamatorio, se alcanza un estado de equilibrio entre el desafío bacteriano y la respuesta inmuno-inflamatoria (Zhong y cols., 2007). De este modo, en lesiones periodontales avanzadas estos niveles de citocinas podrían encontrarse bajos, y la expresión de estas moléculas podría estar regulada por mecanismos epigenéticos, por lo que estos deberían de presentar un patrón hipermetilado. En este contexto, algunos trabajos observaron un estado de hipermetilación para la región promotora de gen COX2, E-Cadherina y TNF $\alpha$  en pacientes con periodontitis crónica (Loo y cols., 2010; Zhang y cols., 2010). Este estado hipermetilado, llevaría a la silenciación de la expresión génica, traduciéndose en menor ARNm de las citocinas proinflamatorias para las que codifica, PGE2 y TNF $\alpha$ . Ambas citocinas se relacionan fuertemente con la patología periodontal. Y se han encontrado niveles aumentados de éstas en las lesiones de periodontitis (Duarte y cols., 2010; Offenbacher y cols., 2010). Sin embargo, también existen estudios que encuentran en lesiones avanzadas de periodontitis niveles bajos de estas citocinas, y sugieren que se ha establecido un estado de equilibrio que evita que siga progresando de manera aguda la pérdida de soporte (Zhong y cols., 2007). Todo ello estaría acorde con los resultados de Loo y cols. (2010) y Zhang y cols. (2010) que encontraron hipermetilación de estos genes que silenciaría o disminuiría la expresión de citocinas inflamatorias.

A este estado hipermetilado se sumarían los estudios de De Oliveria y cols. (2011) y De Faria Amormino y cols. (2013), que observaron un estado hipermetilado para los TLR, iniciadores de la cascada de señalización inflamatoria y sitio de unión importante para la activación de NF- $\kappa$ B, potente iniciador de la pérdida ósea. De nuevo, esta hipermetilación evitaría un estado hiperinflamatorio y se asociaría a un estado de equilibrio.

En cuanto a los ARN no codificantes, miR o miARN, es difícil comparar los distintos estudios incluidos en esta revisión sistemática, ya que la gran mayoría busca en el tejido gingival cuántos miARNs se sobreexpresan o se infraexpresan con diferencias significativas en sanos y pacientes con periodontitis, y de los cientos de miARNs destacan los más relevantes. Estos miARNs podrían presentar un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria. Muchos de los autores analizados, buscaron genes diana para estos miARNs. Destaca el miR-146a que regula negativamente la señalización TLR tras el estímulo bacteriano. El aumento de este miARN se relacionaría con menores niveles de TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$  y otras citocinas, y NF- $\kappa$ B (Xie y cols., 2011); por lo que parece ser que podría ser uno de los encargados de evitar un daño excesivo de los tejidos por una respuesta exagerada. El miR-146a, presenta un gran impacto en la vía interferón e interleucina, suponiendo un papel importante en la patogénesis periodontal. Ambos se encontraron aumentados en los tejidos con patología periodontal (Kadkhodazadeh y cols., 2013). El miR-155 estaba disminuido en los pacientes con periodontitis crónica. Este miARN también se relaciona con la activación de los receptores TLR y receptores de IL, de modo que actuaría de forma similar al miR-146. El miR-301a es un factor represor potente del NF- $\kappa$ B, se ha sugerido que el estímulo creado por los LPS bacterianos y la respuesta inflamatoria del hospedador crónica con liberación de citocinas podrían sobre-expresar miR-301a, lo que llevaría a una disminución del NF- $\kappa$ B (Lee y cols., 2011).

El miR-203 es importante para inducir la diferenciación y reprimir la proliferación celular. Se ha visto que en tejidos con periodontitis en los que existe un alto recambio celular por parte del epitelio de unión y conectivo, los niveles de miR-203 están disminuidos respecto a los tejidos sanos, lo que está de acuerdo con su función. El miR30e modula el metabolismo del conectivo y la inflamación. miR-103, miR-22 y miR-106b, presentan algunos genes diana relacionados con la inflamación y el metabolismo óseo (ILs, PGE2, TNF, etc.). Todos ellos estaban aumentados en los tejidos afectados de patología periodontal (Stoecklin-Wasmer y cols., 2011; Perri y cols., 2012).

Otros miARNs se han relacionado con distintos tipos de cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y diferentes procesos patológicos. El miR-223

es un factor clave en la diferenciación osteoclastica y promueve la apoptosis celular. El miR-150 y el miR-200b, se han relacionado con cáncer, procesos inflamatorios, enfermedades autoinmunes y otros procesos fisiológicos y patológicos. Los resultados sugieren que existe una red de regulación del ciclo celular y movimiento de células inmunes e inflamatorias en los tejidos. En los tejidos periodontales estos miARNs también se encontraban aumentados (Ogata y cols., 2014).

Si se analizan todos los estudios incluidos en este trabajo de revisión, el miR146a es el único miARN que se estudia de forma protagonista en 3 estudios en biopsias gingivales en humanos (Xie y cols., 2011; Motedayyen y cols., 2015; Kadkhodazadeh y cols., 2013). Cuando aumenta miR-146a, disminuye el  $TNF\alpha$ ,  $IL1\alpha$  e  $IL-6$ , y con ello se altera el eje RANK/RANKL/OPG hacia la osteoclastogénesis. Kadkhodazadeh y cols. (2013), observaron que los niveles de miR-146a y miR-499 eran elevados en tejidos con patología periodontal, aumentando los efectos de citocinas proinflamatorias, RANK y MMPs afectando a la respuesta inflamatoria periodontal. Podría ser que niveles altos de miR-146 llevaran a la activación de  $NF-\kappa\beta$ , un factor de transcripción fuertemente asociado a la regulación positiva de la respuesta inflamatoria celular, llevando en última instancia a la liberación de moléculas proinflamatorias. De acuerdo con estos hallazgos, Motedayyen y cols. (2015) encontraron 32,6 veces más elevado este miARN en los tejidos con patología periodontal que en los sanos, asociándolo con correlación positiva con una profundidad de sondaje y una pérdida del nivel clínico de inserción mayores. Además, este mismo estudio observó niveles de  $TNF-\alpha$  e  $IL-6$  más bajos cuanto más alto era el nivel de miR146a. El miR-146 también se ha asociado a niveles bajos de EGF y  $TGF-\beta$ , que disminuyen el potencial de regeneración y podrían relacionarse con respuestas no satisfactorias al tratamiento (Motedayyen y cols., 2015).

La regulación de la transcripción de algunos genes evita que el proceso inflamatorio sea decisivo y permite que se instaure un equilibrio metastable entre inflamación y estímulo. Como se ha ido mencionando, los dos mecanismos analizados se relacionan con genes que están implicados en la síntesis y activación de  $NF-\kappa\beta$ , interleucinas,  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$  etc., lo que podría situar a estos biomarcadores epigenéticos como posibles marcadores diagnósticos, pronóstico e incluso como agentes terapéuticos en el control de enfermedades inflamatorias. Se necesitan estudios clínicos aleatorizados bien diseñados que valoren la utilidad de estos biomarcadores.

Después de realizar una actualización de la búsqueda, se habían publicado 3 artículos que encontraron miARNs en el FCG.



El primero de ellos fue publicado por Saito y cols., en 2017. Observaron en 3 pacientes con periodontitis que estos presentaban una sobre-expresión de miR-332, miR-223, miR-203, miR-205. Posteriormente compararon por PCR en otras muestras de 6 pacientes con periodontitis y vieron que estos mismos miARNs se encontraban aumentados en FCG de pacientes con periodontitis. Este fue el primer estudio que apuntaba la posibilidad de emplear miARNs en FCG como biomarcadores.

Radovic y cols. en 2018, observaron una sobre-expresión de miR-146a y miR-155 en pacientes con periodontitis crónica diabéticos y no diabéticos. Los niveles de estos miARNs se redujeron seis semanas después del tratamiento periodontal básico a niveles comparables con los controles sanos y diabéticos sin periodontitis. Además, los niveles de expresión del miR-146a fueron mayores en pacientes diabéticos con periodontitis que en los pacientes solamente con periodontitis. El análisis multivariable de este estudio reveló que los niveles de miR-146a y miR-155 estaban significativamente asociados con la periodontitis tras ajustar por edad y género (Radovic y cols., 2018).

El tercero corresponde a nuestro grupo de investigación: Micó y cols., 2018, donde también encontramos miARNs en el FCG. Se encontraron seis miARNs (miR-671, miR-122, miR-1306, miR-27a, miR-223, miR-1226), pero solo el miR-1226 mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Micó y cols., 2018). Este estudio piloto sirvió para probar la metodología y ayudarnos a mejorarla. Aunque se publicó en 2018, este estudio se realizó en 2016 con la intención de constatar la posibilidad de encontrar miARNs en el FCG, ya que en ese momento no existían datos en la literatura científica.

A partir de este estudio piloto se desarrolló un protocolo estructurado que será expuesto en el material y método de esta tesis doctoral.

Se pudo observar, que el fluido crevicular gingival permite obtención de muestras de manera sencilla y no invasiva, aportando un mayor valor diagnóstico a estos biomarcadores epigenéticos.

Una limitación de esta revisión sistemática fue que no se incluyeron estudios *in vitro*. Cuando se está estudiando la implicación de un factor dentro de una compleja red de relación multifactorial, los estudios *in vitro* no son adecuados para valorar el efecto de ese factor. Es decir, un mismo ARNnc puede afectar a la transcripción de muchísimos genes, y a la vez la mayor o menor expresión de una molécula puede afectar positiva o negativamente a la expresión de muchas otras (Chen y cols., 2016). Por ello se decidió buscar los resultados obtenidos de estudiar en humanos los tejidos con patología gingival pero sin experimentación *in vitro*, con el objetivo de no excluir del análisis moléculas que

se implican en el proceso biológico y que no podrían incluirse en la experimentación *in vitro*.

A pesar de que las puntuaciones respecto a la calidad metodológica de los estudios observacionales de casos y controles incluidos son medio-altas, la principal limitación es la heterogeneidad en los mecanismos estudiados. Sería interesante que las futuras investigaciones se centraran en los mismos mecanismos en los que se encuentra una mayor asociación con la periodontitis. Además, debido al cambiante estado inflamatorio en los pacientes con enfermedad periodontal, se debería de escoger sujetos con periodontitis no tratada y activa, ya que una vez tratada o estabilizada, estos mecanismos de regulación de la expresión genética podrían alterarse. La heterogeneidad metodológica y el análisis entre distintos mecanismos epigenéticos en distintos genes hizo difícil extraer conclusiones en esta revisión y no fue posible realizar una síntesis cuantitativa o meta-análisis.

De esta revisión sistemática se pudieron extraer las siguientes conclusiones. En los estudios se señala que los mecanismos epigenéticos pueden presentar un papel muy importante en la regulación de la expresión de genes relacionados con procesos inflamatorios. En la periodontitis, los resultados mostraron tanto silenciamiento como sobre-expresión de la transcripción mediada por estos mecanismos epigenéticos. En la mayoría de estudios se encontraron diferencias significativas en los niveles de estos marcadores en tejidos con patología periodontal respecto a sanos. La heterogeneidad de los mecanismos analizados dificultó la obtención de conclusiones sólidas, pero permiten pensar en una posible adaptación al estímulo inflamatorio crónico, de modo que en una primera fase inflamatoria facilitarían la sobre-expresión de un determinado gen, pero una vez cronificado el proceso, silenciarían dicho gen para alcanzar un equilibrio metastable que evitase una destrucción periodontal exagerada.

Los marcadores epigenéticos se postulan como unos buenos marcadores diagnósticos de procesos inflamatorios, debido en gran parte a su dinamismo y estabilidad molecular. Por sus características el fluido crevicular gingival parece ser un medio idóneo, fácilmente accesible y no invasivo para la toma de muestras y análisis de biomarcadores epigenéticos. En periodoncia, la epigenética podría aportar nuevos conocimientos para la comprensión de la patogénesis periodontal que podrían ayudar a responder cuestiones que la biología molecular, la microbiología y la genética no han sabido responder en la actualidad.

# JUSTIFICACIÓN



### 3. JUSTIFICACIÓN

Los marcadores epigenéticos sirven para definir la enfermedad desde un punto de vista no solo patogénico, sino también individual. Es decir, en un paciente concreto sirven para identificar aspectos concretos de los mecanismos patogénicos que intervienen en su enfermedad. Por lo tanto, en el futuro los marcadores epigenéticos serán capaces de “etiquetar” o codificar en un paciente y en un momento dado el estado de su enfermedad. De este modo podremos ajustar el tratamiento a sus inherentes circunstancias patogénicas, es lo que se denomina “medicina de precisión” o individualizada.

Actualmente son muchas las investigaciones centradas en el campo de la epigenética, sobretodo en el ámbito de la medicina oncológica y también en patologías de carácter inmuno-inflamatorio crónico.

La patología periodontal presenta unas circunstancias muy especiales. Existe una continua exposición con el medio externo y esto hace que la respuesta inmuno-inflamatoria frente al desafío bacteriano en algunos individuos se torne desmesurada, y paradójicamente la respuesta encaminada a frenar la infección bacteriana produzca la destrucción de los tejidos. En un intento por frenar el proceso, el organismo se autoregula y evita que la destrucción de los tejidos se produzca de forma aguda, pero esto ocasiona una cronificación del proceso. En esta autoregulación es donde los mecanismos epigenéticos median permitiendo o inhibiendo la expresión de determinados genes relacionados con la síntesis de moléculas involucradas en la respuesta inmuno-inflamatoria.

Se sugiere que existe bastante similitud en el proceso inmuno-inflamatorio entre la periodontitis y diferentes enfermedades sistémicas crónicas. De hecho, se apunta que en muchas ocasiones puede existir un nexo común de relación bidireccional. Por ello, consideramos que es de gran interés estudiar e identificar los factores epigenéticos (miARNs) que se relacionan con la respuesta inmuno-inflamatoria en el periodonto, con el objetivo de extrapolar estos conocimientos a aquellos procesos inmuno-inflamatorios que afectan otras zonas del organismo. Es decir, el periodonto puede servir como un pequeño laboratorio de fácil acceso para estudiar la respuesta inmuno-inflamatoria de un individuo.

Desde el punto de vista de la patología periodontal, la bibliografía señala claramente que cada individuo presenta una susceptibilidad y unas condiciones específicas frente al estímulo inflamatorio y al desarrollo de la patogénesis de la periodontitis. Por otra parte, a pesar de que la investigación centrada en la genética es amplia, su conclusión señala que los marcadores genéticos resultan demasiado estáticos, y por tanto no reflejan la influencia dinámica que existe entre los factores ambientales o de estilo de vida y el desarrollo de la patología.

La hipótesis que se maneja desde el punto de vista epigenético indica que estos factores de riesgo inciden en un cambio a nivel epigenético. Es decir, los mecanismos epigenéticos regulan la expresión genética del individuo, que en un momento dado puede ser modificada por factores internos celulares y metabólicos, así como externos medioambientales o de estilo de vida. Este enfoque, por ejemplo, podría explicar la rápida progresión de la periodontitis en un paciente en el que algún factor externo, como los factores ambientales o de estilo de vida (el estrés, la personalidad, etc...), en un momento dado ocasiona un cambio en el fenotipo inmuno-inflamatorio del individuo y lo hace más susceptible al desafío de la placa bacteriana dental. Como consecuencia de la acción de los factores epigenéticos se produce la infra o sobreexpresión de algunos genes implicados en los procesos de la inmuno-inflamación.

Los escasos trabajos publicados sobre periodontitis y epigenética ya parecen indicar que los mecanismos epigenéticos son los que permiten la adaptación al estímulo inflamatorio crónico. En una primera fase inflamatoria, se favorecería la sobreexpresión de un determinado gen, con el objetivo de generar moléculas encaminadas a frenar la infección. Pero una vez cronificado el proceso, silenciarían dicho gen para alcanzar un equilibrio metastable que evitase una destrucción periodontal rápida y exagerada.

Algunas cuestiones como el por qué existen periodos de actividad y progresión de periodontitis a los que suceden otros silentes o por qué la gran agresividad de la enfermedad en algunos individuos o la falta de respuesta al tratamiento en otros podrían explicarse mediante el estudio de los mecanismos epigenéticos relacionados con la enfermedad periodontal.

En la mayoría de las publicaciones las muestras sobre marcadores epigenéticos son obtenidas a través de biopsia gingival, que es un método demasiado cruento para su uso sistemático. Sin embargo, el fluido crevicular gingival se postula como un buen candidato para el estudio de marcadores epigenéticos, ya que la obtención de una muestra de FCG es fácil, rápida y nada invasiva.

Los miARNs son moléculas que presentan una alta estabilidad, sensibilidad y especificidad. Además, son capaces de reflejar el dinamismo con el que se expresan los genes en relación con el cambio en el entorno celular. Esto justifica su uso como biomarcadores epigenéticos en enfermedades inflamatorias de carácter crónico.

Hay muy pocos estudios que analizan el papel de los miARNs en la periodontitis. La sobreexpresión o infraexpresión de estos miARNs ha demostrado tener influencia en diferentes genes que codifican para moléculas directamente relacionadas con el proceso fisiopatológico de la periodontitis. Por tanto, la expresión de miARNs en el FCG podría definir un estado inflamatorio de susceptibilidad o afectación periodontal.

El interés de estos miARNs no queda únicamente en el diagnóstico, también en poder tipificar a cada individuo en función de su susceptibilidad a la periodontitis o incluso a patologías sistémicas relacionadas con la patología periodontal. La posibilidad de disponer de un “código de barras” propio de cada individuo donde esté definida la susceptibilidad o el riesgo ante un proceso patológico permitiría ajustar de forma individual los tratamientos preventivos específicos.

Con el fin de obtener más conocimientos sobre la relación de los mecanismos epigenéticos y la periodontitis, la hipótesis que se plantea en esta investigación es que al realizar un *high-throughput* o *búsqueda masiva* de miARNs en el fluido crevicular de pacientes con periodontitis crónica avanzada y comparar con un grupo de sujetos sanos, la expresión de estos miARNs será distinta entre los dos grupos.





# OBJETIVOS



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

El objetivo general de esta investigación fue realizar un análisis de *high-throughput* o *búsqueda* masiva de miARNs en el fluido crevicular gingival de pacientes con periodontitis crónica avanzada e individuos periodontalmente sanos.

### 4.2. Objetivos específicos

Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Secuenciar mediante la técnica de SmallRNA-seq (*Next Generation Sequencing*) todos los miARNs presentes en el FCG de sujetos sanos y pacientes con periodontitis crónica avanzada.
2. Estudiar la expresión de los miARNs en pacientes con periodontitis crónica avanzada y sujetos sanos.
3. Seleccionar una firma de miARNs capaz de definir la periodontitis, donde los miARNs estén relacionados con las vías etiopatogénicas implicadas en el desarrollo de la periodontitis.
4. Realizar una validación de los miARNs seleccionados.



# METODOLOGÍA



## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio analítico observacional. El estudio se diseñó incluyendo un grupo de pacientes con periodontitis crónica avanzada no tratada y un grupo control de individuos periodontalmente sanos. A ambos grupos se les realizó la misma exploración periodontal completa y se les tomó muestras de su fluido crevicular gingival.

### 5.2. Comité de ética

El estudio fue aprobado por el comité de Ética e Investigación Experimental de la *Universitat de València* el 7 de noviembre de 2016 (H1477063568528). Se respetaron los principios fundamentales de la declaración de Helsinki relativos a los derechos humanos y cumplió con los requisitos establecidos por la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética (ANEXO 1).

A todos los participantes del estudio se les entregó un documento informativo donde se explicaba en qué consistía el estudio y donde también figuraban los datos de contacto con el equipo investigador. Además, se entregó el correspondiente consentimiento informado por duplicado, de modo que una copia quedaba en manos del equipo investigador y otra en manos del sujeto de estudio (ANEXO 2).

### 5.3. Selección de la muestra

A falta de referencias establecidas en publicaciones anteriores en cuanto a las diferencias en los niveles de expresión de miARNs entre sujetos sanos y pacientes con periodontitis en FCG, y teniendo en cuenta estudios previos con metodología similar, se decidió que la muestra total del estudio estuviera formada por 23 sujetos, de los cuales 11 presentaban periodontitis crónica avanzada y 12 presentaban salud periodontal. El rango de edad elegido para los sujetos incluidos en el estudio fue de 30-60 años.

El volumen de sujetos a reclutar en el estudio se consideró asumible con el flujo de pacientes que se atiende habitualmente en la Unidad de Periodoncia de la "*Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València*".

Los pacientes se seleccionaron de forma consecutiva. Tras comprobar exhaustivamente que cumplían con todos los criterios de selección marcados para poder formar parte del estudio, se empezaba con los registros de anamnesis, clínicos, radiográficos y de toma del fluido crevicular como se especificará más adelante.

Para el grupo control, se eligieron 12 sujetos periodontalmente sanos emparejados por sexo y edad con los sujetos del grupo enfermos. A ambos grupos se les realizaron los mismos registros clínicos y de toma de muestra de FCG. A los pacientes con periodontitis se les realizó una serie radiográfica periapical paralelizada completa y a los sujetos sanos dos radiografías de aletas de mordida.

### 5.3.1. Criterios de inclusión

Para formar parte del estudio, los pacientes debían de cumplir las siguientes condiciones:

#### ● **Grupo de sujetos enfermos:**

1. Edad entre los 30 y los 60 años.
2. Pacientes con periodontitis crónica avanzada (según la clasificación de Armitage de 1999)
3. Presencia de profundidad de sondaje superior a 6 mm en dientes uniradiculares que no presentasen un pronóstico imposible según la clasificación de Kwok y Caton (2007), entendiéndose como pronóstico imposible un diente que ha sufrido abscesos de repetición, con movilidad de grado III y con una pérdida de soporte que junto con otras condiciones indicase la extracción del diente.
4. Ausencia de caries, endodoncias u otros tratamientos dentales en los dientes en los que se iba a tomar las muestras de FCG.

#### ● **Grupo sujetos sanos:**

1. Edad entre los 30 y los 60 años.
2. Se consideraban sujetos sanos los que no presentaban ningún signo de patología periodontal según la clasificación de Armitage de 1999. No debían presentar más de 2 zonas con bolsas superiores a 4 mm en el resto de las zonas de la boca y los índices de placa y gingivales tenían que ser inferiores al 25%.
3. Niveles óseos radiográficos compatibles con salud periodontal.
4. La zona de toma de muestra de FCG debía ser en dientes uniradiculares con salud gingival, sin recesión, sin bolsas periodontales ni sangrado al sondaje.



### **5.3.2. Criterios de exclusión**

Si se cumplía cualquiera de los siguientes supuestos el paciente no podía formar parte del estudio:

1. Pacientes con Enfermedad Periodontal Agresiva en referencia a la clasificación de Armitage, 1999.
2. Pacientes con enfermedades sistémicas: osteoporosis, artritis, diabetes mellitus, enfermedades sistémicas que afecten al sistema inmune-inflamatorio, al metabolismo óseo, o a los tejidos periodontales.
3. Pacientes con medicación de posible impacto en los tejidos periodontales: tratamiento hormonal, bisfosfonatos, antiinflamatorios, inmunosupresores...
4. Toma de antibióticos o antisépticos en los 6 meses previos.
5. Pacientes fuera de rango de edad comprendido entre 30-60 años.
6. Fumadores de más de 10 cigarrillos/día.
7. Pacientes portadores de prótesis removibles.
8. Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.

### **5.3.3. Criterios de retirada durante el estudio**

En el estudio se realizaba la toma de FCG y los registros clínicos el mismo día. Desde que se reclutaba al paciente hasta el día que se realizaba la exploración, cualquiera de las siguientes condiciones podía excluir al individuo de estudio:

1. Toma de cualquier fármaco de los anteriores.
2. Cambio de alguna de las condiciones mencionadas como criterios de inclusión del estudio.

Además, se excluía a los individuos de estudio si se descubría que durante la exploración presentaban algunas de las condiciones mencionadas, o si debido al alto grado inflamatorio de la zona de muestra, se hacía imposible la toma de FCG sin contaminación hemática de la tira de papel.

## **5.4. Secuencia de desarrollo del estudio**

1. Día 1. Constatación de criterios de selección: Primera valoración con sondaje para constatar que existía presencia de bolsas superiores a 6 milímetros en algún diente

uniradicular y que no presentaban criterios de exclusión. Entrega de consentimiento informado y hojas explicativas del estudio al paciente.

### 2. Día 2, siete días después del día 1:

- i. Anamnesis y toma de datos demográficos de los sujetos de estudio
- ii. Toma de muestra de fluido crevicular gingival: se especificará en el siguiente subapartado
- iii. Exploración clínica periodontal completa
- iv. Exploración radiográfica

## 5.5. Registros clínicos

### 5.5.1. Datos demográficos del paciente

- Nombre / Edad /Afectación de enfermedades sistémicas que haya padecido / Alérgias a medicamentos / Toma de fármacos en actualidad o con anterioridad / Motivo de la consulta / Número de cigarrillos consumidos al día.

### 5.5.2. Estudio periodontal completo: periodontograma

- Índice de placa (Quigley y Hein modificado por Turesky y cols., 1970).
- Sangrado al Sondaje: Índice gingival (Ainamo y Bay modificado por Lindhe 1983).
- Sondaje en 6 superficies por diente.
- Afectación de furca: valorada con sonda tipo Nabers.
- Movilidad dental / Recesión gingival / Nivel clínico de inserción.
- Presencia de diastemas, extrusiones, giroversiones u otras condiciones anatómicas de los dientes.

### 5.5.3. Exploración radiográfica

Realización de una serie radiográfica paralelizada periodontal completa en enfermos y de dos aletas de mordida en sanos.

En todos los casos se empleó el Sistema de paralelización radiográfica O-Ring (Densply®). Dieciséis radiografías en el caso de la serie:

- Ocho periapicales posteriores: radiografías de molares y premolares de cada cuadrante.
- Seis periapicales de anteriores: radiografías de incisivos superiores e inferiores y cuatro de cada uno de los caninos.
- Dos aletas de mordida.

## **5.6. Material clínico y de laboratorio empleado para el estudio (Anexo 3)**

Las tablas correspondientes a la relación del material empleado en el estudio aparecen plasmadas en el Anexo 3.

## **5.7. Calibración del Periotron 8000®**

El Periotron® 8000 (OralFlow Inc., Plainview, NY, USA), cuantifica el volumen de FCG recogido en una banda o papel absorbente, el Periopaper strip®. Como se ha mencionado anteriormente, funciona como un condensador, es decir, mide la capacitancia eléctrica de la tira de papel humedecida al colocarla entre las valvas del instrumento (Deinzer y cols., 1999; Griffiths, 2003).

Para la calibración del Periotron 8000® se necesita el siguiente instrumental:

- Jeringa de Hamilton (Hamilton ®, Hamilton Company, USA): jeringa con calibración marcada a cada microlitro, que se emplea para depositar en cada perio-paper la cantidad de suero indicada en cada paso de la calibración.
- Periopaper Strips®: en su parte blanca se iban añadiendo los distintos volúmenes para la curva de calibración.
- Suero Humano: es el fluido empleado para la calibración por su similitud con el fluido crevicular (Chapple y cols., 1995).
- Pinzas: para la presión del periopaper por su parte anaranjada.
- Tabla de calibración excel: en la que se anotaban los distintos registros y se hallaban las medidas para la curva de calibración.

Antes de empezar con la calibración del aparato para las muestras de FCG, se tiene que seleccionar de la parte posterior del Periotron® el modo “Perio”. De esta forma, se encenderá una luz led en la parte anterior del aparato que indicará el modo seleccionado.

El siguiente paso es cerrar las mandíbulas del Periotron® y registrar desplazando la rueda blanca mediante valores comprendidos entre -1 y +1 hasta situarnos en el 0. El valor de la pantalla parpadeará durante unos 16 segundos hasta finalmente quedar en el valor fijo de calibración a “0”.

La calibración se consigue con suero humano empleando una jeringa de 2 µl. Se van registrando los valores periotron a incrementos de 0,1; empezando por 0,1µl y acabando en 0,9µl de suero humano. Se registran 5 veces cada uno de los incrementos y se calcula la media de unidades Periotron® para cada volumen de suero (Tabla 5). Se recomienda el empleo de suero humano por la similitud en características de viscosidad y fluidez con el FCG (Chapple y cols., 1995).

Para la obtención de suero humano, se extrajeron muestras sanguíneas obtenidas del propio investigador (PA) mediante tubo fármaco seco. Se centrifugaron las muestras a 3.200 rpm quedando el suero en la parte superior y la parte hemática en el fondo. Con una pipeta se separó la porción de suero que se almacenó y congeló en un micro eppendorf.

Tabla 5. Calibración general del periotron						
µl	1	2	3	4	5	media
0,1	22	18	16	17	20	18,6
0,2	41	43	42	45	43	42,8
0,3	62	55	54	58	58	57,4
0,4	81	79	75	77	79	78,2
0,5	87	93	86	99	91	91,2
0,6	110	107	106	109	105	107,4
0,7	116	129	117	121	130	122,6
0,8	138	140	135	135	138	137,2
0,9	142	130	143	133	136	136,8

Como medida de comprobación de calibración cada día de toma de muestra, se elegían 2 volúmenes de suero y se comprobaba que el valor de la media no difería más de 5 unidades respecto a la media de calibración del día uno. Si se producía un cambio en más de 5 unidades, se debía volver a calibrar el Periotron® (Tabla 6).

Tabla 6. Ejemplo de comprobación de calibración						
µl	1	2	3	4	5	media
0,2 µl	43	37	41	40	40	40,2
0,6 µl	105	110	105	102	107	105,8

### 5.7.1. Procedimiento para la calibración (Figura 19)

1. Se selecciona del tubo con suero los microlitros adecuados para cada uno de los incrementos para la calibración.
2. Se coloca el volumen en la parte blanca del periotron.
3. Una vez se ha colocado adecuadamente la tira de papel en el Periotron® sin tocar la zona anaranjada, se deja el periopaper 16 segundos hasta que el display deja de parpadear y nos da una unidad periotron que anotamos en la tabla. Posteriormente, se limpia adecuadamente el Periotron® con un papel impregnado con alcohol que se evapora rápidamente y se repite el procedimiento cinco veces para cada incremento de volumen como se ha indicado.
4. Se construye una curva de calibración como la que se observa en la imagen 4 (figura 19). Esta curva de calibración permite convertir los valores periotron a microlitros.

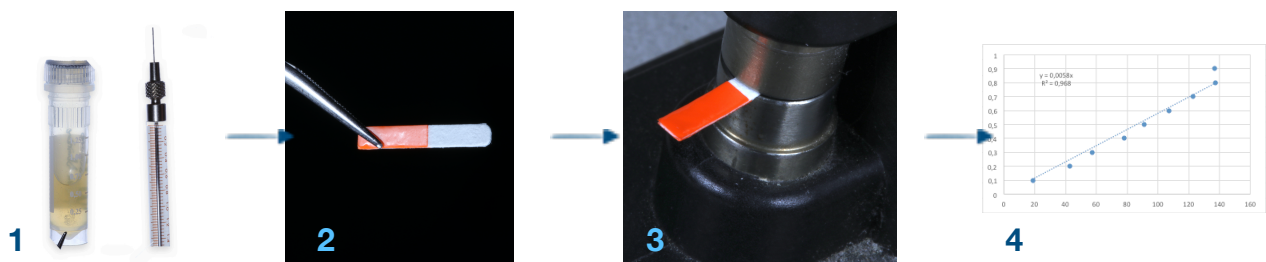


Figura 19. Procedimiento de calibración del Periotron®.

### 5.7.2. Posibles errores en la lectura de la muestra en el Periotron 8000®

Durante la lectura de la tira de papel (Periopaper strip®) pueden aparecer en la pantalla del Periotron 8000® algunos mensajes de error que aparecerán después de una señal sonora. Esto indica que se ha producido un error de lectura. Los códigos que pueden aparecer más frecuentemente son:

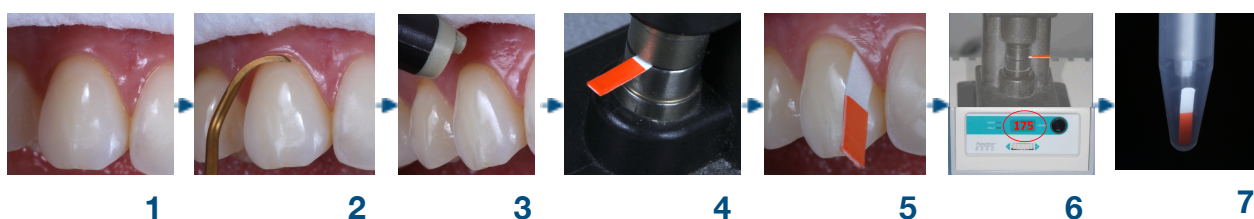
- E01: Interrupción de la lectura de muestra, las valvas se han abierto antes de terminar la lectura.
- E02: Indica un exceso de fluido, el Periotron® no es capaz de convertir el volumen de la muestra en una puntuación periotron.
- E03: Indica un número excesivamente alto de medida de unidades periotron fuera de escala (+200 a +999).
- E04: Indica un número excesivamente negativo fuera de escala (-100 a -999).

Para volver a medir la muestra es necesario abrir las valvas, cerrarlas, y volverlas a abrir. En ese momento, se puede introducir una nueva muestra para su lectura.

## 5.8. Procedimiento de toma de muestra de fluido crevicular gingival

### 5.8.1. Selección del punto de recogida

Se seleccionaban 3 dientes uniradiculares con PS superior a 6 mm, y se tomaban 3 muestras (tres tiras de papel) de FCG de cada uno de los dientes.



**Figura 20.** Procedimiento para la toma de muestra de FCG.

### 5.8.2. Procedimiento para la toma de muestra de FCG (Figura 20)

1. Se aísla el área con algodones para evitar la contaminación salivar.
2. Se elimina la placa supragingival con una cureta, evitando tocar el margen gingival.
3. Se seca sutilmente la zona de recolección, en dirección: apical a coronal.
4. Se coloca un Paperstrip® en el Periotron® para situar su valor a "0".
5. Se introduce entonces el Paperstrip® o tira de papel en el surco gingival hasta que se nota una ligera resistencia. Se deja 30 segundos en el surco gingival.
6. A continuación, se transfiere al Periotron® y se deja durante 16 segundos hasta que el Periotron® deja de parpadear y apunta en su pantalla el valor Periotron® de la muestra. Se anota el dato (unidades periotron) en una tabla excel.
7. Finalmente, se guarda el periopaper en un eppendorf seco y se almacena en un congelador a -80°C. El procedimiento desde la toma del fluido hasta el almacenado a -80°C se realizó en todos los casos antes de un minuto.
8. El último paso, se realizaba en el laboratorio, extrayendo y analizando la muestra de FCG del periopaper como se expondrá en el siguiente subapartado. Se empleó la primera toma de muestra de FCG de uno de los dientes para la primera parte del

estudio. Para la validación de los miARNs se empleó la primera toma de FCG de otro diente distinto. El resto de muestras quedaron almacenadas a -80°C para su uso posterior en otros estudios.

## 5.9. Procedimientos y registros de laboratorio

El análisis de las muestras de FCG se realizó en el laboratorio de la empresa *Epidisease (EpiDisease S.L. C/Catedràtic Agustín Escardino, 9. Paterna-Valencia-España 46980. B98650781)*.

*Epidisease SL* es una empresa experta, y de gran experiencia en el estudio y detección de factores epigenéticos, y que es *Spin-Off* del INCLIVA y de la *Universitat de València*. En las siguientes páginas se explican los procedimientos de laboratorio y el tratamiento bioinformático y bioestadístico de los datos.

### 5.9.1. Extracción del material biológico del Periopaper® y purificación del ARN total de la muestra de FCG

Para extraer el ARN y solubilizar todas las moléculas (ácidos nucleicos y proteínas) contenidas en la muestra de FCG y adsorbidas en las tiras de papel, los Periopapers® se sumergieron en 400 µl de tampón PBS (pH 7.0) (Gibco™, ThermoFisher, Inc. Waltham, MA, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el Periopaper® se sujeta en el extremo superior por pinzamiento entre la tapa y el borde del tubo. A continuación, se centrifuga cada muestra a 500 r.p.m durante 10 minutos. Finalmente, se guarda esta disolución a -80°C.

Para proceder a la extracción de ARN, se emplearon 200µl de la solución de PBS (que contenía el material biológico total recogido tras la centrifugación). Para ello se utilizó el Kit miRNeasy Serum/Plasma® (Qiagen, ThermoFisher, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### ***Procedimiento para el kit miRNeasy Serum/Plasma***

Todos los pasos se realizaban a temperatura ambiente excepto el paso 6.

1. Preparación de las muestras de FCG: Descongelación (como se ha explicado en el apartado 5.9.1).

## Metodología

2. Adición de 5 volúmenes de reactivo de lisis QIAzol a la muestra (por ejemplo, para una muestra de 200µl añadir 1 ml de reactivo para la lisis). Mezclado con el vórtex.
3. Incubación de la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C).
4. Adición de cloroformo en un volumen igual al de la muestra inicial (por ejemplo, 200µl de muestra, añadir 200µl de cloroformo). Agitar vigorosamente durante 15 segundos.
5. Incubación a temperatura ambiente durante 3 minutos.
6. Centrifugación durante 15 minutos a 12,000rpm a 4°C de temperatura.
7. Transferir la fase superior acuosa a un nuevo tubo, evitando transferir cualquier interfase. Adición de 1,5 volúmenes de etanol al 100% (por ejemplo, para 600µl de fase acuosa, añadir 900 µl de etanol). Mezclar por pipeteado.
8. Pipetear hasta 700µl de la muestra incluyendo cualquier precipitado, en un tubo de columna giratoria RNeasy MinElute de 2 ml. Cerrar la tapa y centrifugar a  $\geq 8000 \times g$  durante 15 segundos a temperatura ambiente. Descartar el fluido sobrante.
9. Repetir el paso 8 empleando el resto de la muestra.
10. Adición de 700µl de Buffer RWT al tubo de columna giratoria RNeasy Min Elute. Cerrar la tapa y centrifugar a  $\geq 8000$ rpm durante 2 minutos. Descartar el fluido sobrante.
11. Pipetear 500µl de Buffer RPE en el tubo de columna giratoria, cerrar la tapa y centrifugar a  $\geq 8000$ rpm durante 15 segundos. Descartar el fluido sobrante.
12. Adición de 500 µl de etanol al 80% en el tubo de columna giratoria de RNeasy MinElute. Cerrar la tapa y centrifugar a  $\geq 8000$ rpm durante 2 minutos. Eliminar el fluido sobrante y el tubo colector.
13. Colocar el tubo de columna giratoria RNeasy MinElute en un tubo de recolección de 2 ml. Abrir la tapa del tubo de columna y centrifugar a máxima potencia durante 5 minutos para secar la membrana. Descartar el fluido sobrante y el tubo de recolección.
14. Colocar el tubo de columna RNeasy MinELute en un nuevo tubo de recolección de 1,5 ml y añadir 14µl de agua libre de RNAsas directamente en el centro de la columna giratoria de la membrana. Cerrar la tapa y centrifugar durante 1 minuto a velocidad máxima para eludir o diluir el ARN.



### **5.9.2. Análisis de miARNs**

Una vez extraído *el ARN*, se diluyó en 75 µl de Agua libre de enzimas *ARNasas*. La cantidad total de ARNs (conteniendo miARNs y otros ARNs de pequeño tamaño) se obtuvo mediante la medida espectrofotométrica de la absorbancia a 260 nm, con el sistema espectrofotométrico de microvolumenes *Nanodrop 2000* (ThermoFisher Scientific). Antes de empezar con la secuenciación, estas medidas espectrofotométricas permiten ver si en las muestras analizadas se espera encontrar miARNs.

### **5.9.3. Generación de librerías y secuenciación masiva (análisis de los miARNs por tecnología Next Generation Sequencing (NGS, fase discovery))**

La generación de las librerías de ARNs de pequeño tamaño se realizó mediante el kit NEXTFLEX® Small RNA-Seq kit v3 for Illumina Platforms (Bioo Scientific® Corporation, Texas, USA). Una vez seleccionadas las librerías, se procedió a la secuenciación de los ARNs de pequeño tamaño con el equipo NextSeq 550 (Illumina, San Diego, CA, USA) con el kit NSQ 500 High Output KT v2 (75 CYS) (Illumina, San Diego, CA, USA).

La tecnología NGS permite la secuenciación de millones de fragmentos de ADN basándose en la amplificación y lectura en paralelo de millones de secuencias.

#### **5.9.3.1. Generación de librerías**

Construir una librería consiste en preparar las muestras para ser secuenciadas. Es decir, fragmentar las moléculas de ácidos nucleicos y unir los fragmentos a los adaptadores y “barcodes” o secuencias específicas de etiquetado que permiten el multiplexado de las muestras, ya que cada “barcode” es único para cada muestra. A continuación se procede a la selección de los fragmentos y a la cuantificación de las librerías.

A partir de ARN total obtenido de las 23 muestras de FCG de individuos seleccionados de cada grupo (pacientes con periodontitis n=11; sujetos sanos n=12) se generaron las librerías utilizando el kit NEXTFLEX® Small RNA-Seq kit v3 for Illumina Platforms (Bioo Scientific® Corporation, Texas, USA), utilizando para ello hasta 23 “barcodes” o secuencias específicas de etiquetado diferentes.

La Tabla 7, muestra cada una de las secuencias empleadas para cada una de las muestras.

Tabla 7. Índices y secuencias de los adaptadores utilizados en la construcción de las librerías para cada una de las muestras secuenciadas.			
Nº	Muestra	Índice	Secuencia
1	P7	A026	ATGAGC
2	P8	A027	ATTCCT
3	P9	A028	CAAAAG
4	P10	A029	CAACTA
5	P11	A030	CACCGG
6	P12	A031	CACGAT
7	P13	A032	CACTCA
8	P14	A033	CAGGCG
9	P15	A034	CATGGC
10	P16	A035	CATTTT
11	P17	A036	CCAACA
12	C1	A037	CGGAAT
13	C2	A038	CTAGCT
14	C3	A039	CTATAC
15	C5	A040	CTCAGA
16	C6	A041	GACGAC
17	C7	A042	TAATCG
18	C8	A043	TACAGC
19	C9	A044	TATAAT
20	C10	A045	TCATTC
21	C11	A046	TCCCGA
22	C12	A047	TCGAAG
23	C13	A048	TCGGCA

Los adaptadores poly-adenilados 3'-4N y los adaptadores 5'-4N se ligaron a las muestras conteniendo los small-ARNs, que luego se convirtieron a cADN mediante retrotranscripción inversa. Los fragmentos generados por cADN se amplificaron mediante una reacción de PCR utilizando cebadores con etiquetas específicas. Según lo recomendado por el fabricante se utilizó una PCR de 25 ciclos y una dilución de 1/4 de los adaptadores de acuerdo con la cantidad de muestra de partida (50 ng - 1 ng). La selección del tamaño de las librerías se realizó utilizando el sistema de preparación Sage Pippin (Sage Science) con los casetes de gel de agarosa al 3% para la selección de los fragmentos que estaban entre 100 pb – 250pb. El tamaño, la pureza y la concentración de ARN de las

librerías se comprobaron en un bioanalizador de Agilent Technologies 2100 utilizando un chip de ADN de alta sensibilidad.

Cada librería se verificó en el sistema Qiaxcel para asegurar la ausencia de bandas que no correspondían a miARNs y se cuantificaba mediante PCR a tiempo real (QuantiStudio5, LifeTechnologies Inc.) con capacidad para 384 muestras.

Se constituyeron “pools” de muestras con concentraciones idénticas para cada una de las muestras y se secuenciaron cada una en un canal de la cámara de flujo del sistema. Finalmente, las librerías se secuenciaron en un instrumento Illumina NextSeq 550 (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) mediante un procedimiento de ejecución de lectura única de 50 ciclos con el kit NSQ 500 High Output KT v2 (75 CYS) (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.).

### **5.9.3.2. Estudio bioinformático de la expresión de los miARNs obtenidos por secuenciación masiva NGS**

En primer lugar, se realizó un control de calidad de los datos en crudo obtenidos de la secuenciación. Este control permitió conocer si era necesario eliminar alguna de las secuencias por contaminación por rARN (ARN ribosomal), si había que eliminar bases que tenían baja calidad o los adaptadores usados durante el proceso de secuenciación.

Tras este primer análisis se eliminaron los adaptadores y en caso de ser necesario se hizo un filtrado de las secuencias por tamaño y calidad.

Posteriormente se realizó un nuevo control de calidad, con el fin de comprobar que las acciones anteriores, no hubiesen provocado una pérdida significativa de la calidad y no se hubiese introducido un nuevo sesgo técnico.

Los programas utilizados para realizar los controles de calidad y el filtrado y eliminación de adaptadores fueron dos:

- FastQC (<http://bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>).
- Cutadapt (<http://cutadapt.readthedocs.org/en/stable/>).

Aquellas lecturas que superaron los criterios de calidad impuestos fueron alineadas frente al genoma humano depositado en UCSC (*University of California Santa Cruz*) (*versión GRCh38*). A continuación, se cuantificaron las lecturas correspondientes a miARNs maduros obtenidos de miRBase v21, obteniendo como resultado una tabla con tantas filas como miARNs maduros, y tantas columnas como muestras.

Tomando esta matriz como referencia, se realizaron los estudios de expresión diferencial, comparando pacientes versus controles, utilizando para ello scripts propios basados en la *metodología DESeq* (Anders y Huber, 2010).

En los análisis estadísticos se tuvieron en cuenta las variables que caracterizaban a cada una de las muestras (sanos y periodontitis). Con el fin de seleccionar un conjunto de miARNs que tuvieran un papel importante en la patogénesis de las enfermedades periodontales, se utilizaron métodos de expresión diferencial, análisis de componentes principales, clustering y clasificación. Para el procesado de lecturas se utilizó el software *Cutadapt*, y para el mapeo y recuento la suite *Subread* (<http://subread.sourceforge.net/>). Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando lenguaje R (lenguaje de programación utilizado para el tratamiento estadístico de grandes volúmenes de datos).

### **5.9.3.3. Análisis de sobrerrepresentación ORA y enriquecimiento de rutas biológicas KEGG implicadas en la fisiopatología de la periodontitis**

Para la identificación de rutas moleculares relevantes en el contexto de la fisiopatología de la periodontitis se realizó un análisis de sobrerrepresentación génica (ORA) utilizando los genes diana de los 19 miARNs expresados diferencialmente. Un análisis ORA se basa en encontrar rutas moleculares en las que un conjunto de genes que participan en estas rutas moleculares se ven alterados por el efecto de los miARNs que se han incluido en el análisis. Para ello, se ha utilizado el paquete de análisis bioinformático denominado *clusterProfiler* en R y se ha empleado un p valor de 0.05.

Paralelamente, a partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron los miARNs en base a las rutas fisiopatológicas (KEGG o Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) en las que se sabe que intervienen, y en base a los conocimientos que tenemos sobre la fisiopatología de las enfermedades periodontales.

Se empleó la herramienta DIANA TOOLS para este fin (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=site/index>). Finalmente, se seleccionaron aquellas rutas biológicas KEGG que se encontraron por ambos procedimientos.

### **5.9.4. Validación de la firma de miARNs en FCG de pacientes periodontales por RT-qPCR mediante la tecnología “stem loop”**

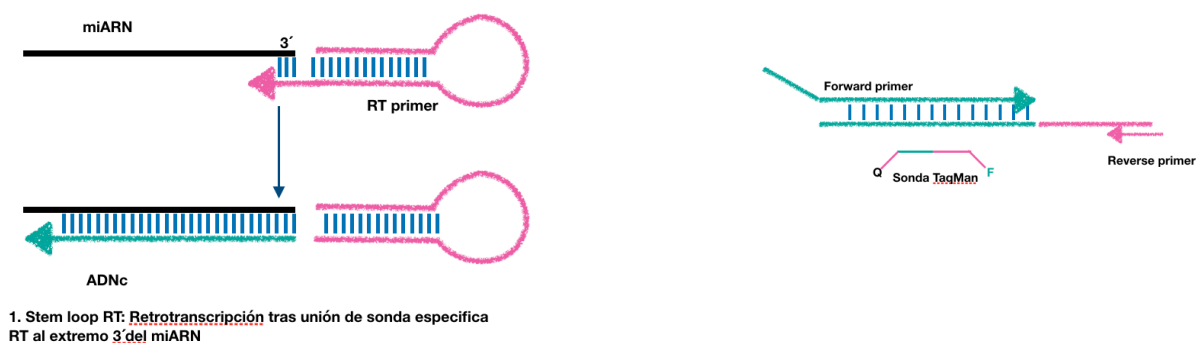
Para la validación de la firma de miARNs, se emplearon las muestras de FCG tomadas de dientes diferentes de los mismos sujetos de estudio. Es decir, se empleó la

primera toma de un diente para la secuenciación y selección de miARNs; y la primera toma de otro diente diferente (de los 3 dientes de cada sujeto del estudio) para la validación de los miARNs seleccionados. El método bioquímico empleado para la validación fue la RT-qPCR mediante tecnología “stem loop” de TaqMan.

El método de cuantificación de los miARNs por RT-qPCR mediante la tecnología “stem loop” implica dos pasos:

- 1) la retrotranscripción del miARN a cADN: usando sondas específicas tipo horquilla (“stem loop”) que se unen al extremo 3’ del miARN y la enzima transcriptasa reversa que retrotranscribe el miARN a una copia de ADN complementario (ADNc).
- 2) la amplificación de este cADN: por qPCR con unos cebadores (primers Forward y Reverse) y una sonda específica del miARN estudio (Varkonyi-Gasic y cols., 2007) (Figura 21).

La tecnología “stem loop” aporta una mayor especificidad ya que permite la unión específica al miARN y evita uniones no específicas a otros ARNs.



1. Stem loop RT: Retrotranscripción tras unión de sonda específica RT al extremo 3' del miARN

**Figura. 21.** Esquema representativo de un ensayo RT-PCR basado en la química de “stem-loop” para facilitar la retrotranscripción de los miARNs. Tras la amplificación del miARN y su conversión a cADN durante la retrotranscripción, es posible realizar una reacción de PCR usando un par de cebadores y una sonda TaqMan específica.

#### 5.9.4.1. Procedimiento RT-qPCR a tiempo real mediante tecnología “stem loop”

##### **Retrotranscripción (RT)**

Se retrotranscribieron 100ng de ARN total obtenido de FCG, previamente cuantificado en el Nanodrop 2000. Para la reacción de retrotranscripción se utilizó el *kit TaqMan miRNA Reverse Transcription*, con primers específicos de miARN, mediante la tecnología “stem loop” (Part No. 4366597, Applied Biosystems. Inc, CA; USA). La mezcla

## Metodología

(mix) de RT se preparó añadiendo cada uno de los componentes en el orden en el que aparecen en la tabla 8 y siguiendo las recomendaciones del manual de este kit (versión F con modificaciones para la optimización del procedimiento). La reacción de RT fue de 20  $\mu$ l/pocillo, llevando a cabo reacciones multiplex, en las que para una misma muestra se retrotranscribieron todos los miARNs de interés en una misma reacción/pocillo. Esta etapa se llevó a cabo en el *Termociclador de Applied Biosystems 7900HT* (Applied Biosystems / Thermo Fisher, USA) empleando el programa recomendado por Applied Biosystems (Tabla 9).

**Tabla 8: Componentes de la mix de RT.**

	Componentes MIX	conc	Vol ( $\mu$ l) Concentracion		
			10	15	20
1	Primer o pool de Primers (5x)	0,2x	0,4 cada primer	0,6 cada primer	0,8 cada primer
2	dNTPs 100 mM	2mM	0,2	0,3	0,4
3	Reverse Transcriptasa Multiscribe, 50 U/uL	100	2	3	4
4	buffer RT 10x	1x	1	1,5	2
5	inhibidor ARNsa 20 U/uL	0,25	0,125	0,19	0,25
6	Agua libre de nucleasas		V**	V**	V**
7	Muestra de ARN		V*	V*	V*

**Tabla 9: Programa de RT (equipo termociclador Applied Biosystems 7900HT (Applied Biosystems / Thermo Fisher, USA)).**

Fase	Tiempo	Temperatura
1	30 min	16°C
2	30 min	42°C
3	5 min	85°C
4	$\infty$	4°C

### **Amplificación**

Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado reduciendo el volumen de reacción a 10  $\mu$ l/pocillo y usando 5  $\mu$ l de *TaqMan Universal Master Mix II, no UNG* (ref. 4440040, Applied Biosystems / Thermo Fisher, USA), 0,5  $\mu$ l de *TaqMan small RNA assay* (20X) (Applied Biosystems / Thermo Fisher, USA), 3,5  $\mu$ l de agua libre de nucleasa y 1  $\mu$ l de producto de RT.

Las referencias de los miARNs empleados fueron: hsa-miR-338-5p (assay ID 002658 thermo fisher scientific), hsa-miR-199a-3p (assay ID 002304 thermo fisher

Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada (científico), hsa-miR-30a-5p (assay ID 000417 thermo fisher científico) hsa-miR-146a-5p (assay ID 000468 thermo fisher científico).

La qPCR se llevó a cabo en el equipo *Quant-Studio 5* (Applied Biosystems) con el protocolo recomendado por el mismo fabricante: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C de 15 segundos y 60°C durante 1 minuto (Tablas 10 y 11).

En base al número de lecturas más estable (conteo por millón de lecturas más alto), la desviación estándar y la dispersión a través de todas las muestras, el análisis bioinformático destacó un miARN que se empleó como control endógeno: hsa-miR-223-3p (assay ID 002295 thermo fisher científico). El hsa-miR-223-3p sirvió para normalizar la expresión de los miARNs con los datos obtenidos del FCG, para esto se empleó el método delta-delta CT. ( $R = 2^{[CP\ test - CP\ control]}$   $R = 2^{\Delta CP}$ ;  $R = 2^{-[\Delta CP\ test - \Delta CP\ control]}$ ;  $R = 2^{-\Delta\Delta CP}$ ).

**Tabla 10. Componentes de la mix para qPCR.**

Componente	Reacción 10 uL (V uL)
TaqMan Small RNA assays (20x) <sup>&amp;</sup>	0,5
TaqMan Universal Master MIX II (2x)	5
Agua libre de nucleasas	3,5
Muestra de ADNc	1

**Tabla 11. Programa qPCR.**

Activación Enzima	PCR	
	45 ciclos	
	Desnaturalización	Cebado/extensión
95°C	95°C	60°C
10 min	15 s	60s

## 5.10. Estudio estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados, la media fue tomada como la medida de más tendencia, y la desviación estándar (SD) como la medida de dispersión.

En el análisis descriptivo de la muestra, para las variables de tipo cualitativo, se construyeron las correspondientes tablas de frecuencia. Para las variables cuantitativas: se procedió al cálculo de los estadísticos descriptivos: media, mediana, intervalo de confianza (IC) para la media y desviación estándar (SD).

Para la comparación de medias se aplicaba siempre las pruebas de normalidad con el objetivo de evaluar la prueba adecuada de comparación (prueba T de Student o U de Mann-Whitney). Se asumieron diferencias estadísticamente significativas cuando el p-valor era inferior a 0,05 (\*).

Para los cálculos se empleó el programa SPSS (*IBM® SPSS® statistics versión 24.0*).

### 5.10.1. Estudio estadístico de validación de miARNs como biomarcadores

Para medir las diferencias entre el grupo de periodontitis y el grupo de sanos, se emplearon diversas pruebas estadísticas, usando diferentes variables como la edad, sexo, y otras. El test de Mann-Whitney se empleó para cambiar los valores de miARNs a valores continuos para permitir la comparación entre grupos.

La capacidad diagnóstica de cada uno de los miARNs fue validada por análisis de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Se calculó el área bajo la curva, diagnóstico de sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN). El punto óptimo de corte se determinó por valores de alta sensibilidad más especificidad y eficiencia empleando el índice de Youden.

Los p-valores inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. El análisis de los datos se realizó con el programa SPSS versión 24 (IBM corporation).



# RESULTADOS



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Descripción de la muestra

#### 6.1.1. Homogeneidad de grupos

Para la realización del estudio se seleccionaron, según los criterios de inclusión y exclusión descritos en el apartado de material y métodos, un total de 23 sujetos, de los cuales 11 pertenecían al grupo de enfermos de periodontitis y 12 al grupo de sanos.

Para detectar la homogeneidad de ambos grupos de estudio, se procedió al cálculo sobre las variables empleadas como criterios de inclusión/exclusión.

Respecto a la **edad**, en el grupo de sanos la media fue de 50,17 años ( $\pm 7,34$ ) mientras que en el grupo de enfermos la media de edad fue de 46,36 ( $\pm 9,88$ ). La variable edad se comportaba de forma normal en ambos grupos de participantes, y se procedió al contraste entre grupos mediante la prueba de comparación de medias para muestras independientes T de Student, obteniendo un p valor de 0,304. No existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en cuanto a la variable edad.

En relación con el **sexo**, en ambos grupos el número de mujeres fue superior al de hombres. El porcentaje de hombres para el grupo de sanos fue del 33,3% y para el grupo de enfermos del 27,3%. Mientras que el porcentaje de mujeres fue del 66,7% en el grupo de sanos y 72,7% en el grupo enfermos. Las muestras fueron homogéneas en cuanto al sexo (Test Chi-cuadrado  $p=0,765$ ).

Respecto al **hábito tabáquico**, en el grupo sanos el 75% eran no fumadores y el 25% fumadores de menos de 10 cigarrillos/día. En el grupo de periodontitis, el 63,6% eran no fumadores y el resto fumadores de menos de 10 cigarrillos/día. La comparación de estos datos entre ambos grupos no expuso diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,406$ , test Chi-Cuadrado).

Por tanto, los grupos eran homogéneos en cuanto a edad, sexo y hábito tabáquico.

En el grupo enfermos de periodontitis, se calculó si las variables “Profundidad de Sondaje”, “Índice de placa”, “Nivel Clínico de Inserción” y “Porcentaje de sangrado gingival” se comportaban de forma normal mediante el test estadístico Kolmogorov-Smirnov. Las cuatro variables se comportaban de forma normal tanto en el grupo de sanos como en el de enfermos.

### 6.1.2. Comparación entre grupos

En el grupo de sanos, la media del nivel clínico de inserción fue de 2,92mm (IC 2,66-3,17) mientras que en el grupo de enfermos fue de 5,06mm (IC 4,60-5,52). La profundidad de sondaje presentaba medias en el grupo “sanos” de 2,29mm (IC 2,14-2,44) y en el grupo “enfermos” de 4,04 (IC 3,76-4,31). En cuanto al índice de placa, el grupo “sanos” obtuvo valores de 2,03 puntos de media (IC 1,70-2,36); y en el grupo “enfermos” la media fue de 3,32 (IC 2,85-3,61). El porcentaje de sangrado al sondaje medio para los sanos fue de 13,90% (IC 5,09-22,7) mientras que en los enfermos la media fue de 80,19% (IC 67,5-92,8),

Una vez comprobada la normalidad en el comportamiento de estas variables, se procedió a la aplicación de la prueba estadística *T de Student* para muestras independientes.

Los resultados mostraron que existía una diferencia estadísticamente significativa para las cuatro variables ( $p < 0,000$ ) entre ambos grupos (Tabla 12).

Tabla 12. Descriptiva de variables.			
Variable	Controles	Casos	p valor
<b>NCI</b>	2,92 (IC 2,66-3,17)	5,06 (IC 4,60-5,52)	$p < 0,0001$
<b>PS media</b>	2,29 (IC 2,14-2,44)	4,04 (IC 3,76-4,31)	$p < 0,0001$
<b>IP media</b>	2,03 (IC 1,70-2,36)	3,32 (IC 2,85-3,61)	$p < 0,0001$
<b>Porcentaje de sangrado Gingival</b>	13,90% (IC 5,09-22,72)	80,19% (IC 67,5-92,8)	$p < 0,0001$

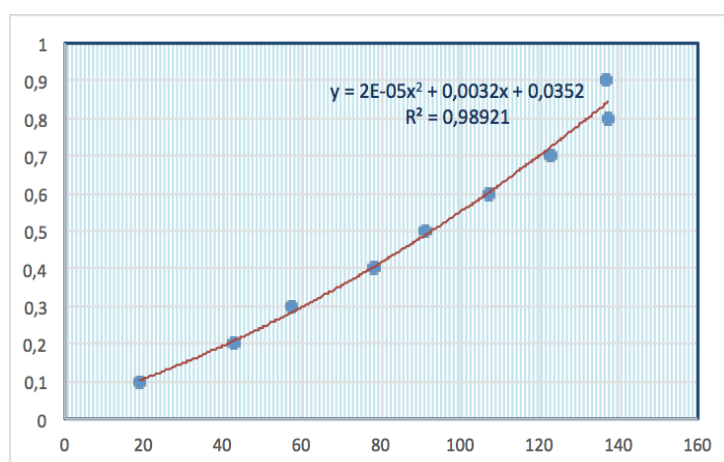
NCI= Nivel Clínico de inserción; PS = Profundidad de Sondaje; IP = Índice de Placa

Respecto a la variable “Movilidad”, en el grupo de sanos solo el 0,29% de los dientes presentaban movilidad de grado 1 y ningún diente presentaba movilidades de grado 2 o 3. Mientras que en el grupo de enfermos, un 20,67% de los dientes presentaba movilidad grado 1, un 4,36% movilidad grado 2, y un 3,06% movilidad grado 3. Al aplicar la U de Mann-Whitney, las diferencias para las variables movilidad en ambos grupos eran estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 6.1.3. Comparación de los volúmenes de FCG entre grupos

Los valores Periotron se transformaron a microlitros ( $\mu\text{l}$ ) empleando la ecuación de ajuste obtenida mediante la calibración del equipo. En el eje Y se anotaron los valores de volumen en  $\mu\text{l}$  y en el eje X los valores de Periotron.

Al ajustar los puntos obtenidos de la gráfica de calibración, se obtuvo la ecuación:  $[Y=2\text{E}-05x^2+0,0032x+0,0352]$ . El coeficiente de correlación ( $R^2$ ) fue de 0,989.



**Figura 22.** Curva de calibración de Periotron®.

**Tabla 13.** Estadística de grupo para la variable Volumen de FCG.

	ESTADO	N	Media	Desviación estándar	Media de error
<b>volumen fluido en ul en D1 valor medio</b>	<b>control</b>	12	0,092127	0,635508	0,0183455
	<b>caso</b>	11	0,552805	0,2865319	0,0863926
<b>volumen fluido en ul en D2 valor medio</b>	<b>control</b>	12	0,096509	0,0554472	0,0160062
	<b>caso</b>	11	0,513952	0,3445201	0,1038767
<b>volumen fluido en ul en D3 valor medio</b>	<b>control</b>	12	0,115755	0,0936630	0,0270382
	<b>caso</b>	11	0,545618	0,3317654	0,1000310

La tabla 13, ilustra los descriptivos referentes a los datos obtenidos para el volumen de FCG medio de las tres muestras en cada uno de los 3 dientes que se emplearon para la toma de la muestra en el grupo de sanos y de pacientes periodontales. En todos los

## Resultados

dientes la media del volumen de FCG era mayor para el grupo de pacientes con periodontitis.

En el caso de la variable volumen de FCG no se comportaba de forma normal. Para la comparación de medias se empleó el test no paramétrico U de Mann-Whitney, que demostró que existía una diferencia significativa entre las medidas de volumen de FCG en el grupo de enfermos al comparar con el grupo de sanos (Tabla 14).

Tabla 14. Comparación de medias de volumen de FCG (U de Mann-Whitney)			
	VFC medio ul D1	VFC medio ul D2	VFC medio ul D3
<b>U de Mann-Whitney</b>	12,000	17,000	5,000
<b>W de Wilcoxon</b>	90,000	95,000	83,000
<b>Z</b>	-3,323	-3,016	-3,754
<b>Sig. asintótica (bilateral)</b>	p=0,001	p=0,01	p<0,0001
<b>Significación exacta [2*(sig. unilateral)]</b>	p< 0,0001 <sup>b</sup>	p< 0,0001 <sup>b</sup>	p< 0,0001 <sup>b</sup>

a. Variable de agrupación: ESTADO  
b. No corregido para empates.

## 6.2. Resultados al primer objetivo planteado en esta Tesis Doctoral: Secuenciar mediante la técnica de SmallRNA-seq (Next Generation Sequencing) todos los miARNs presentes en el FCG de sujetos sanos y pacientes con periodontitis crónica avanzada

### 6.2.1. Resultados Nanodrop 2000 y Bioanalyzer Agilent 2100

Previamente a la secuenciación se extrajeron y cuantificaron los miARNs mediante espectrofotometría de absorbancia (Nanodrop 2000 y Bioanalyzer Agilent 2100). La cuantificación de los miARNs que se extrajeron del FCG tras la desadsorción del miARN purificado de la columna, mostró los valores que aparecen en la Tabla 15. Los valores de absorbancia obtenidos mediante espectrofotometría de microgota con el sistema Nanodrop se emplean para ver si en el proceso de purificación de ARN se ha conseguido aislar el ARN y en su caso la contaminación que puede arrastrar la muestra durante el proceso de purificación. Uno de los parámetros que se suele evaluar es el cociente de absorbancias 260/280 que representa el ratio entre la absorbancia de ácidos nucleicos y el contenido de proteínas. En este caso se considera valores de cuantificación adecuados

Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada cuando en el cociente 260/280 los valores sean  $>1,20$  (aunque estos valores son más importantes en la cuantificación de ARN total). Por otro lado, también se evalúa el cociente de absorbancias 260/230, que informa sobre la contaminación que arrastra la muestra de alcoholes que se han utilizado durante el proceso de purificación y que pueden interferir posteriormente en el proceso de determinación por reacción de la cadena de polimerasa.

En cuanto a la concentración de ácidos nucleicos, se considera aceptable para los miARNs concentraciones superiores a 10 ng/ $\mu$ l.

Con estas medidas se pudo ver que en las muestras analizadas de FCG contenían ARN y por tanto podían ser utilizadas para el siguiente paso de secuenciación de smallRNA-seq.

Tabla 15. Cuantificación miARNs en FCG por espectrofotometría de absorbancia (Nanodrop 2000)

	Conc. ac. nucleicos (ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230	Factor
<b>C1</b>	16,9	0,422	0,317	1,33	0,48	40.00
<b>C2</b>	16,7	0,417	0,305	1,37	0,07	40.00
<b>C3</b>	21,9	0,547	0,402	1,36	0,10	40.00
<b>C5</b>	19,3	0,483	0,353	1,37	0,12	40.00
<b>C6</b>	17,2	0,430	0,314	1,37	0,10	40.00
<b>C7</b>	19,4	0,486	0,336	1,45	0,05	40.00
<b>C8</b>	17,9	0,448	0,331	1,36	0,37	40.00
<b>C9</b>	14,8	0,370	0,270	1,37	0,08	40.00
<b>C10</b>	30,0	0,750	0,519	1,45	0,05	40.00
<b>C11</b>	17,2	0,431	0,311	1,39	0,18	40.00
<b>C12</b>	18,8	0,469	0,338	1,39	0,10	40.00
<b>C13</b>	11,8	0,294	0,211	1,39	0,12	40.00
<b>H<sub>2</sub>O</b>	0,4	0,010	0,012	0,84	-0,02	40.00
<b>P7</b>	26,5	0,663	0,458	1,45	0,21	40.00
<b>P8</b>	18,7	0,468	0,331	1,41	0,19	40.00
<b>P9</b>	22,5	0,562	0,413	1,36	0,12	40.00
<b>P10</b>	15,3	0,383	0,282	1,36	0,12	40.00
<b>P11</b>	13,9	0,348	0,258	1,35	0,12	40.00
<b>P12</b>	17,2	0,429	0,293	1,46	0,15	40.00
<b>P13</b>	17,9	0,448	0,306	1,47	0,03	40.00
<b>P14</b>	18,2	0,456	0,318	1,43	0,04	40.00
<b>P15</b>	13,5	0,338	0,252	1,34	0,15	40.00
<b>P16</b>	17,3	0,434	0,282	1,54	0,04	40.00
<b>P17</b>	14,3	0,358	0,258	1,39	0,05	40.00

## Leyenda:

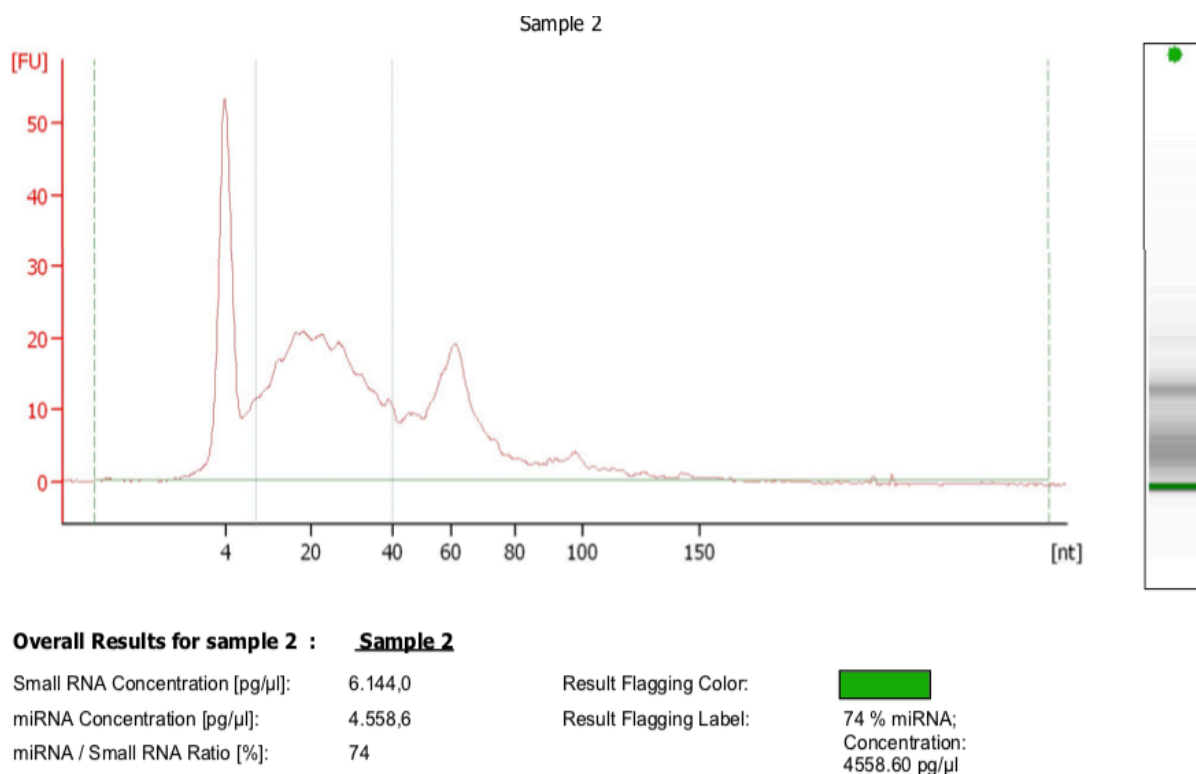
Conc. ac. nucleicos= concentración ácidos nucleicos en la muestra; ng/μl= concentración en nano-gramo por micro-litro; C= Controles Sanos; P= Pacientes; H<sub>2</sub>O= Agua, empleada para calibrar el nanodrop.



Para la evaluación del contenido en porcentaje de miARNs en el ARN purificado a partir de la muestra de FCG, se utilizó un ensayo Agilent Small RNA Assay (Agilent) con el sistema Bioanalyzer Agilent 2100, que permite analizar moléculas de ARNs con un tamaño de entre 6 a 150 nucleótidos (nt).

El perfil electroforético del ARN del FCG mostró diferentes bandas, probablemente debido a la presencia de diversas familias de ARNs. De hecho, del perfil electroforético de los ARNs de pequeño tamaño se cuantificaron como miARNs aquellas moléculas con una longitud de entre 10 a 40 nucleótidos (aunque los miARNs tienen un tamaño entre los 18-24 nt). Por otro lado, el ARN nucleolar pequeño o ARN<sub>pn</sub> tiene de 60-150 nucleótidos y los pre-miARNs tienen de 90-150 nucleótidos por lo que también se observan las bandas correspondientes a estas familias de ARNs de pequeño tamaño en el ensayo de perfil electroforético.

En la figura 23 se muestra un electroferograma representativo obtenido con el ensayo Agilent Small RNA Assay, donde se pueden observar diferentes patrones electroforéticos, para cada una de las muestras e identificándose un hombro con relativa buena señal de fluorescencia (FU) centrado en 20 nt y que corresponde al enriquecimiento de la fracción de miARNs durante el proceso de purificación del ARN. El resto de gráficas junto con los resultados de la cuantificación de miARNs mediante Bioanalyzer puede consultarse en el ANEXO 4.



**Figura 23:** Electroferograma representativo de una de las muestras de FCG, que ilustra la cuantificación relativa (FU; fluorescence units) de miARNs (fracción de 10-40 nt) mediante Bioanalyzer. Se pueden observar diferentes patrones electroforéticos y un enriquecimiento en la fracción 20 nucleótidos que se corresponde con la fracción de los miARNs. En esta muestra existe una concentración de 4,56 ng/μl de miARNs.

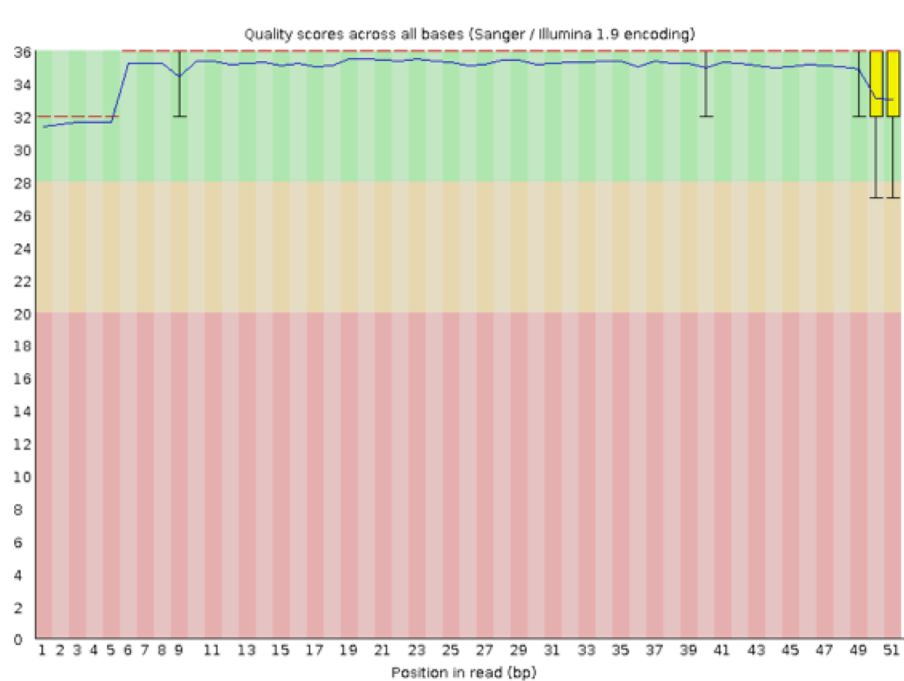
### 6.2.2. Análisis de calidad de lecturas

El número de lecturas obtenidas fue elevado en todas las muestras: la media fue de 10.649.614; el máximo de lecturas: 33.083.947; y el mínimo: 6.033.240.

La medición de la calidad mediante *Phred quality score* es una medida de calidad que se emplea para determinar la calidad de las bases nucleicas generadas por la secuenciación. *Phred* se define como una propiedad relacionada logarítmicamente con la probabilidad de error al identificar o nombrar una base nucleica. Con puntuaciones >30, la precisión de que la base secuenciada sea nombrada correctamente es del 99,9%.

La longitud de bases para las lecturas fue de 51 pares de bases (pb) en cada una de las muestras. La calidad obtenida en función de la posición en la secuencia obtuvo una puntuación *Phred* alta (media > 32).

En la figura 24 se muestra la calidad por base de las lecturas de una de las muestras a modo representativo, ya que en todas las muestras las calidades fueron muy similares. La gráfica sirve para ilustrar que la calidad de las lecturas fue muy alta y en consecuencia los datos obtenidos del proceso de secuenciación de las librerías construidas tienen elevada robustez.



**Figura 24.** Calidad Phred por base de lectura. En el eje **x** se muestra la posición de las lecturas y en el eje **y**, la calidad Phred obtenida. La calidad media mínima alcanzada fue de 32.

### 6.2.3. Eliminación de los adaptadores y filtrado de secuencias por tamaño y calidad

Según los resultados de calidad vistos en el análisis anterior, se realizaron varias acciones de eliminación de los adaptadores y el filtrado según la calidad de las secuencias (eliminación de adaptadores del extremo 3', de las lecturas con una calidad inferior a 20 y de las secuencias con una longitud menor a 18 pb). Después de este filtrado, el número de lecturas se redujo en todas las muestras, aunque continuó siendo alto (media: 5.868.600; máximo: 10.622.667; mínimo: 1.456.472). Las calidades de las lecturas se mantuvieron con los mismos valores que tenían antes de ser procesadas.

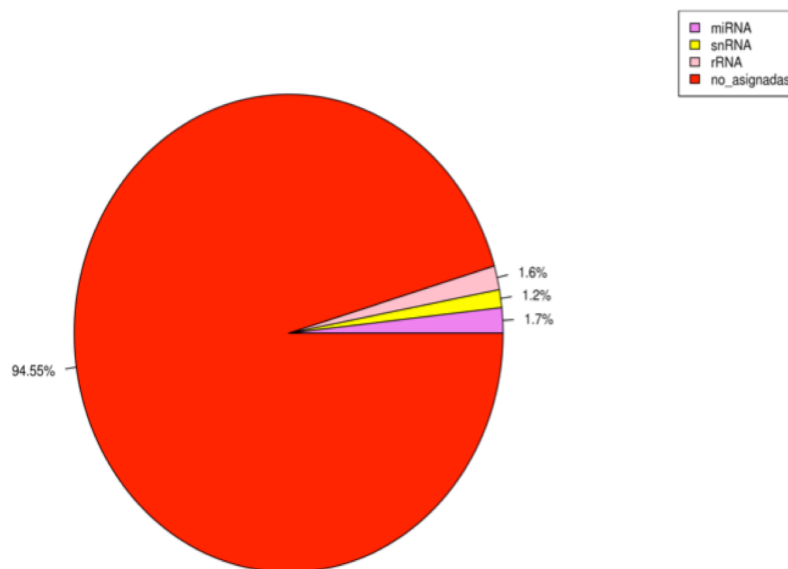
### 6.2.4. Mapeo y cuantificación de las lecturas

Para el mapeo, las lecturas fueron alineadas con el genoma humano de referencia (última versión GRCh38) para identificar y cuantificar las lecturas que

## Resultados

correspondían a miARNs maduros obtenidos de la base de datos miRbase v21 (Kozomara A y Griffiths-Jones S, 2014).

En la figura 25, se puede ver que la mayoría de las lecturas no pudieron ser asignadas a ningún elemento del genoma, bien porque no pudieron ser alineadas (57,7%) o bien porque no se identificó su origen. El porcentaje de miARNs detectados en las muestras de FCG fue bastante bajo, solo el 1,7% del ARN se correspondía a miARN. También fueron bajos los porcentajes de fragmentos de ARN ribosomal y de otros ARNs de pequeño tamaño. No existían datos en la literatura sobre el porcentaje de miARNs que se podía secuenciar en FCG. En estas muestras de FCG, el 1,7% del total de ARNs se pudo secuenciar cómo miARNs.



**Figura 25.** Porcentaje de lecturas no asignadas y asignadas a distintos biotipos del genoma. De todas las lecturas por secuenciación, un 1,7% se correspondía a miARNs en el FCG.

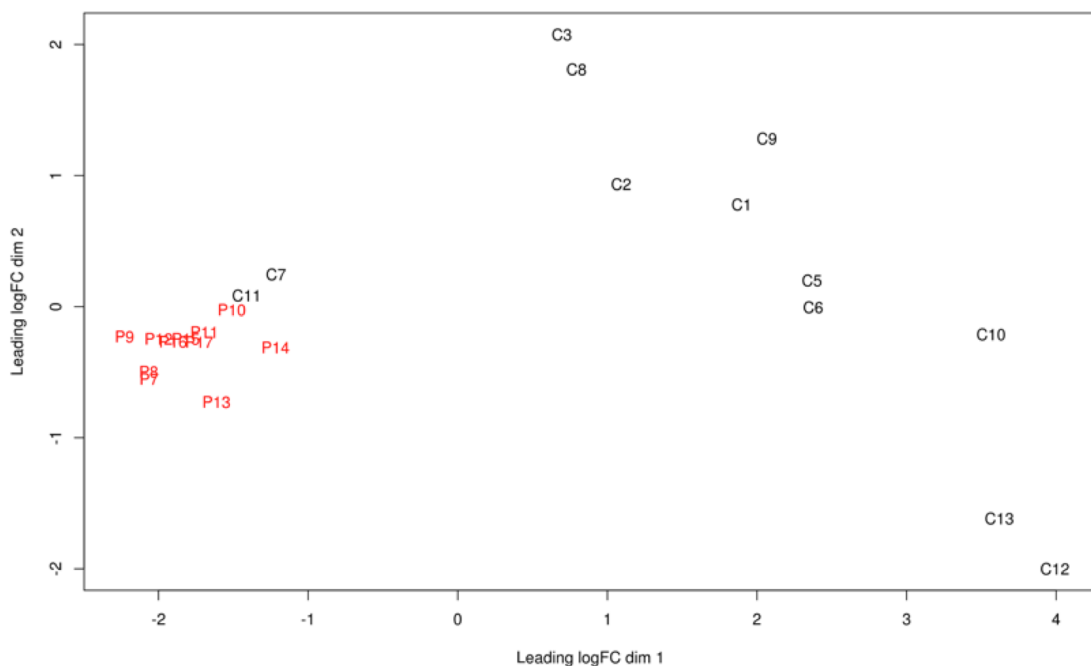
Por tanto, el resultado al primer objetivo planteado en esta tesis doctoral responde que se pudo secuenciar cómo miARN un 1,7 % del total de los ARNs encontrados en las muestras de FCG estudiadas.

### 6.3. Resultados respecto al segundo objetivo: Estudiar la expresión de los miARNs en pacientes con periodontitis crónica avanzada y sujetos sanos.

En un primer análisis exploratorio de los datos, se realizó mediante un gráfico de escala multidimensional (PCA, Principal Component Analysis), con los niveles de expresión de los miARNs a través de todas las muestras. El método PCA es un método estadístico que permite representar la información aportada por múltiples variables en solo unos pocos componentes.

En la figura 26, se observa que las muestras de los pacientes y los controles presentaban un perfil de expresión de miARNs bastante diferente y separado en una de las dimensiones, lo cual diferenciaba la mayor parte de las muestras del grupo de pacientes con periodontitis respecto al grupo control sano. Además, las muestras de pacientes aparecían bastante agrupadas en ambas dimensiones, lo que hace pensar en un perfil de expresión de miARNs bastante homogéneo.

Dos de los controles (C7 y C11) se encontraban más cercanos a la expresión de miARNs que agrupaban a los pacientes que a los controles. Los valores en los individuos sanos presentaban una mayor dispersión.



**Figura 26.** Gráfico que ilustra la expresión de todos los miRNAs a través de las muestras de pacientes y controles sanos.

## Resultados

Posteriormente se realizó un filtrado de miARNs con el fin de seleccionar sólo aquellos miARNs que alcanzaban al menos 1 conteo por millón (cpm) de lecturas (en un mínimo de 11 muestras que representaba el tamaño del grupo más pequeño). El valor de cpm proporciona una cuantificación relativa de las secuencias, y esta se corresponde con el número de lecturas de una misma secuencia por cada millón de secuencias totales de la muestra.

Por otra parte, el logFC es el resultado de comparar los cpm de los miARN de los controles sanos y de los pacientes. Por tanto, es el valor que proporciona información de la expresión diferencial. Cuando el valor de logFC es positivo implica una mayor expresión del miARN en los pacientes con periodontitis, mientras que si presenta un valor negativo, existirá mayor expresión del miARN en los sujetos sanos, o lo que es lo mismo el miARN en cuestión estará muy poco expresado en las muestras de los pacientes con periodontitis.

Con los criterios de sólo seleccionar los miARNs que alcanzaron al menos 1 cpm en un mínimo de 11 muestras, se consiguieron identificar un total de 148 miARNs y que además resultaron tener un número de lecturas aceptable para continuar con el estudio de expresión diferencial (Anexo 5).

### **6.3.1. Resultados del análisis de expresión diferencial**

A continuación, se realizó el análisis de expresión diferencial con los 148 miRNAs que cumplieron con los criterios de aceptabilidad indicados en el apartado anterior.

Como resultado del análisis bioinformático, se obtuvieron un total de 19 miARNs que se expresaban de forma significativa, de los cuales 11 estaban sobreexpresados y 8 subexpresados en pacientes con periodontitis avanzada respecto a los controles sanos, con un nivel de significación  $p < 0,005$  y un FDR (false discovery rate o p-valor corregido)  $< 0,05$  (99,95%).

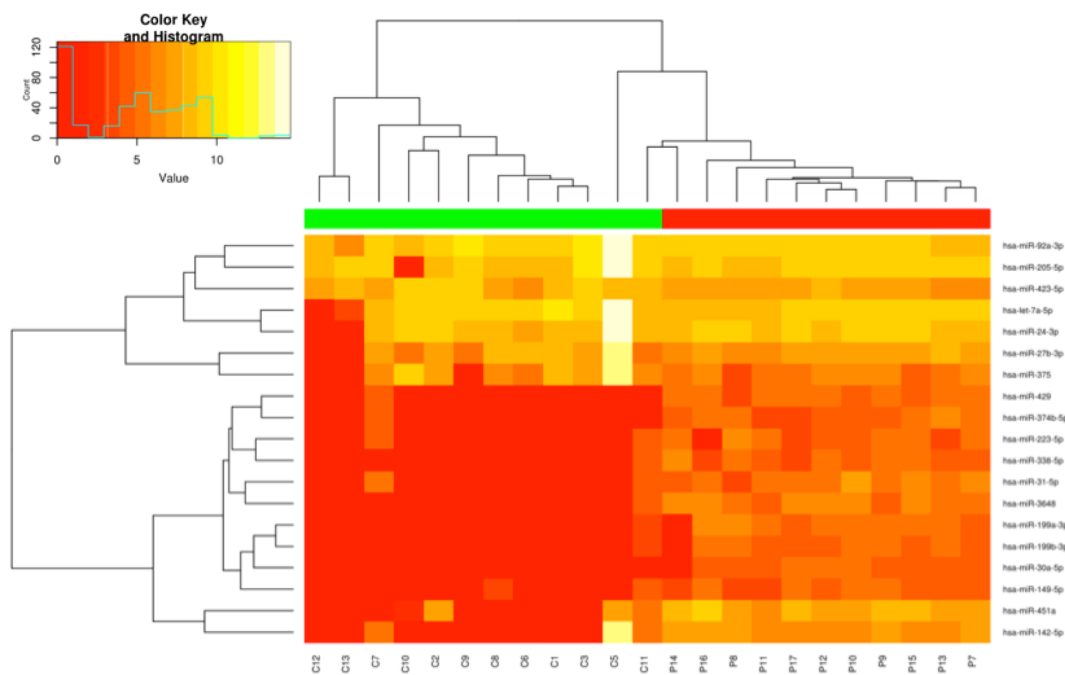
A continuación, se muestran los resultados del test para los miARNs significativos (Tabla 16).

<b>Tabla 16. Expresión diferencial de miARNs entre el grupo de pacientes con periodontitis avanzada comparado con el grupo control sano</b>				
<b>miRNA</b>	<b>logFC</b>	<b>logCPM</b>	<b>PValue</b>	<b>FDR</b>
<b>hsa-miR-30a-5p</b>	5,836904615	7,924747402	<b>7,34101E-08</b>	1,0865E-05
<b>hsa-miR-375</b>	-7,68933613	17,17047014	<b>2,04595E-06</b>	0,0001514
<b>hsa-miR-199a-3p</b>	5,704360725	8,947205669	<b>6,27788E-05</b>	0,00252559
<b>hsa-let-7a-5p</b>	-4,71804207	18,79246901	<b>6,82593E-05</b>	0,00252559
<b>hsa-miR-27b-3p</b>	-5,21009215	17,06366072	<b>9,64869E-05</b>	0,00285601
<b>hsa-miR-92a-3p</b>	-4,0046465	18,55396453	<b>0,000124062</b>	0,00306019
<b>hsa-miR-205-5p</b>	-4,26571276	18,56301782	<b>0,000234391</b>	0,00440094
<b>hsa-miR-24-3p</b>	-4,47808537	18,47031105	<b>0,000237889</b>	0,00440094
<b>hsa-miR-199b-3p</b>	4,855058888	8,048445068	<b>0,000368917</b>	0,00552413
<b>hsa-miR-3648</b>	4,961791761	9,766037845	<b>0,000373252</b>	0,00552413
<b>hsa-miR-338-5p</b>	4,835655507	8,618364532	<b>0,000600762</b>	0,00808298
<b>hsa-miR-374b-5p</b>	4,5374868	8,416166596	<b>0,000843982</b>	0,01040911
<b>hsa-miR-423-5p</b>	-2,01701343	14,12056636	<b>0,001374785</b>	0,0156514
<b>hsa-miR-429</b>	4,253175214	8,746856355	<b>0,001715994</b>	0,01814051
<b>hsa-miR-142-5p</b>	-6,1245523	17,24718771	<b>0,001871992</b>	0,01847032
<b>hsa-miR-149-5p</b>	3,493510564	7,97828403	<b>0,003237536</b>	0,02994721
<b>hsa-miR-451a</b>	3,158572179	12,89081299	<b>0,003888477</b>	0,03385262
<b>hsa-miR-223-5p</b>	3,734841684	8,631323177	<b>0,004219957</b>	0,03469742
<b>hsa-miR-31-5p</b>	3,631292375	9,617433101	<b>0,00452904</b>	0,03527884

**Leyenda:**  
logFC: logaritmo en base 2 del fold change. Un valor de logFC negativo corresponde a un miRNA sub- expresado y un valor de logFC positivo significa que el miRNA está sobre expresado respecto a la condición de referencia.  
logCPM: logaritmo en base 2 de los conteos por millón de lecturas que obtuvo el miRNA.  
P-value: p valor  
FDR: False discovery rate (p-valor corregido).

## Resultados

En la figura 27 se muestra un *heatmap* (dendograma que agrupa simultáneamente miARNs y muestras según su similitud). El *heatmap* agrupa por similitud de expresión de los miARNs, y en este caso, gracias a la firma establecida de los miARNs, se puede separar a los pacientes de los controles según la expresión de una firma concreta de miARNs. Así, se pudo ver que según la expresión de los 19 miARNs significativos, la mayoría de las muestras de los controles estaban agrupadas entre sí y separadas de las muestras del grupo de pacientes. Las únicas excepciones eran los controles 7 y 11 que parecen más similares a la de pacientes y por eso el dendograma las agrupa junto con el grupo de pacientes de periodontitis.



**Figura 27.** *Heatmap* con los niveles de expresión de los 19 miRNAs significativos a través de las muestras de pacientes con periodontitis (barra roja superior) y controles (barra verde superior). Según la selección de los 19 miARNs que pueden verse a la derecha de la gráfica, en esta figura puede observarse como los pacientes con periodontitis presentan niveles de expresión más altos de estos miARNs (identificados con colores más claros). En cambio, los controles presentan claramente un predominio del color rojo, lo que indica poca expresión de estos miARNs. Esta figura sirve para ilustrar que la firma de miARNs establecidas parece diferenciar claramente a los pacientes con periodontitis de los sujetos sanos.

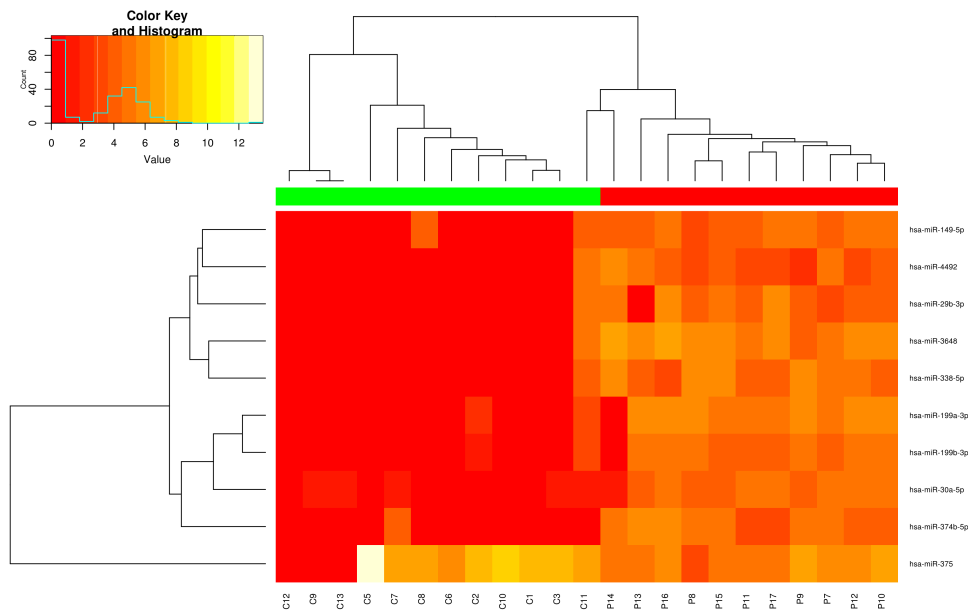


Posteriormente, se volvió a analizar la expresión diferencial ajustando por la variable sexo usando un test F de cuasi-verosimilitud (Lun y cols., 2016).

Adicionalmente, los conteos obtenidos de la secuenciación fueron transformados con un método de estabilización de la varianza, usando el paquete de *R DESeq* (Anders y Huber, 2010). Los datos transformados se usaron para ajustar un modelo de regresión logística con penalización Lasso (Friedman y cols., 2010), usando los 10 miARNs diferencialmente expresados que se obtuvieron al ajustar por sexo y tomando las 23 muestras del estudio como observaciones.

Los miARNs más importantes del modelo fueron seleccionados realizando una validación cruzada. Aquellos miARNs cuyos coeficientes resultaron ser distintos de 0 para el valor de *lambda* con el que se obtuvo el mínimo error promedio de validación cruzada, fueron seleccionados.

El análisis bioinformático que se realizó pudo volver a dibujar un nuevo *Heatmap* con los 10 miARNs que finalmente se seleccionaron para definir a los pacientes con periodontitis crónica avanzada del estudio (Figura 28).



**Figura 28.** *Heatmap* con los niveles de expresión de los 10 miARNs significativos a través de las muestras de pacientes con periodontitis (barra superior roja) y controles (barra superior verde) tras ajustar por la variable sexo. La figura sirve para ilustrar que al ajustar por la variable sexo la firma de los 10 miARNs que aparecen a la derecha del *heatmap* identifica de una manera aun más contundente a los pacientes con periodontitis crónica avanzada. Se puede observar como los pacientes con periodontitis (P) presentan colores de la gráfica mas anaranjados lo que indica una mayor expresión de estos miARNs. Por contraposición, los sujetos sanos o controles (C), presentan un predominio de color rojo, lo que indica poca expresión de estos miARNs. El control 11 y 7 presentan una expresión ligeramente diferente al resto de sujetos sanos tal y como se veía en la figura 27. Por tanto, esta firma de estos 10 miARNs parece diferenciar claramente a los sujetos con periodontitis avanzadas.

Por tanto, como resultado al segundo objetivo planteado en esta tesis doctoral, se obtuvo que los sujetos sanos y los enfermos de periodontitis crónica avanzada tienen una expresión de miARNs a nivel de FCG distinta, y esta expresión diferencial es capaz de diferenciar los sujetos sanos de los enfermos de periodontitis. Tras ajustar por la variable sexo, se encontraron 10 miARNs que presentaban niveles de expresión distintos entre pacientes con periodontitis y sujetos sanos. Estos 10 miARNs fueron: hsa-miR-199a-3; hsa-miR-199b-3p; hsa-miR-338-5p; hsa-miR-374b-5p; hsa-miR-30a-5p; hsa-miR-375; hsa-miR-3648; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-4492 y hsa-miR-149-5p.

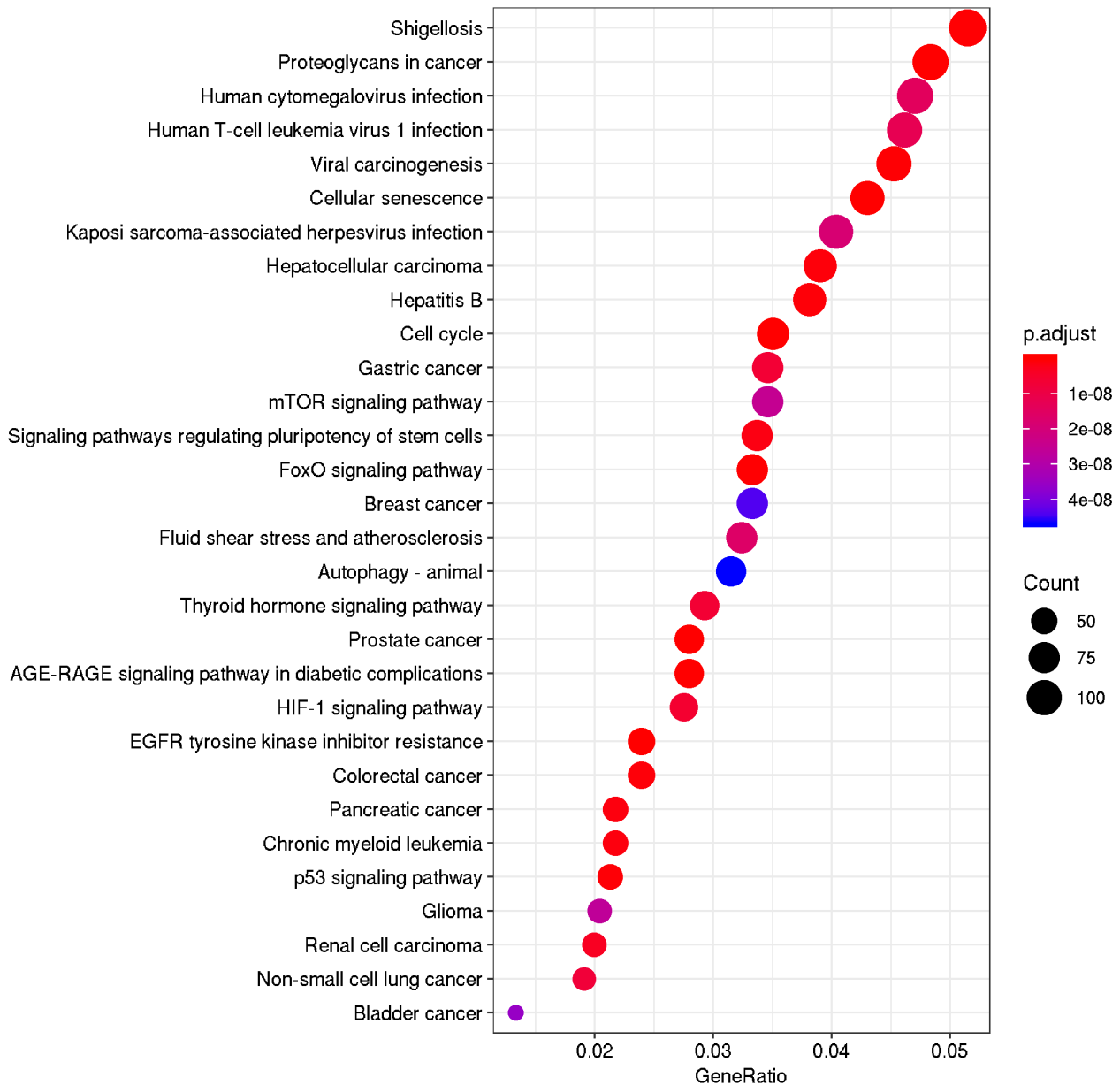
#### **6.4. Resultados respecto al tercer objetivo: Seleccionar una firma de miARNs capaces de definir la periodontitis y que estuvieran relacionados con las vías etiopatogénicas implicadas en el desarrollo de la periodontitis.**

En primer lugar, se buscaron en las publicaciones las rutas biológicas en las que se han descrito que participaban estos 10 miARNs. El siguiente paso consistió en seleccionar de los 10 miARNs aquellos que pueden estar más directamente relacionados con aquellas rutas que están relacionadas con la patogénesis de la periodontitis.

##### **6.4.1. Análisis de sobrerrepresentación (ORA) y de las rutas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) en las que participan los miARNs significativos**

El análisis de sobrerrepresentación (ORA) es una aproximación experimental para determinar si algunas funciones o procesos biológicos están sobrerrepresentados (enriquecidos) en relación a una lista de elementos analizados como pueden ser genes, transcritos, miARNs, proteínas, metabolitos, etc. El análisis ORA se basa en la identificación de rutas, valorando qué proporción de los genes diana de los miARNs identificados están presentes en comparación con el ratio de genes involucrados en estas mismas rutas en la totalidad de los genes del organismo. En nuestro caso, el análisis ORA se realizó para identificar las rutas KEGG que están enriquecidas en los miARNs identificados con expresión diferencial en los grupos de estudio. Para ello, se ha utilizado el paquete clusterProfiler en R y se empleó un p valor de corte de 0.05.

Se obtuvieron un total de 122 rutas de KEGG enriquecidas con el análisis ORA. De estas rutas se representaron mediante un diagrama de dotplot las 30 rutas KEGG con mayor GeneRatio, que es la proporción de genes involucrados en la ruta, en relación al conjunto de genes diana.



**Figura 29.** Treinta rutas KEGG con mayor “*gene ratio*” enriquecidas mediante análisis ORA con los 19 miRNAs expresados diferencialmente entre el grupo de pacientes con periodontitis frente al grupo control. Un GeneRatio más elevado indica un mayor número de genes implicados en la ruta.

Además, se utilizó otra aproximación para la identificación de rutas moleculares que podrían estar relacionadas con la periodontitis. Esta aproximación se basó en el uso de la herramienta *DIANA-miRPath versión 3* (con el algoritmo activado de *DIANA-TarBase v7.0*) que permite el análisis basado en interacciones experimentalmente validadas. Es decir, al introducir los diez miARNs, el software analiza mediante búsqueda cruzada las publicaciones científicas en que se demuestra la relación del miARN con la ruta biológica.

De esta forma a partir de los 10 miARNs se obtuvieron un total de 50 rutas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), de las cuáles se descartaron las

directamente relacionadas con procesos oncogénicos y las que no se encontró asociación con alguno de los sucesos que entendemos participan en el curso de la etiopatogenia de la periodontitis (marcado en rojo en la tabla 17).

Además, se registró el proceso biológico concreto que se relacionaba con dichas rutas. Para esta selección, se realizó una búsqueda en las distintas bases de datos con el fin de encontrar estudios que validen experimentalmente la asociación de esta vía con la patogénesis de la periodontitis.

La tabla 17 muestra la selección de las rutas KEGG en color verde escogidas en función de la búsqueda cruzada en las distintas bases de datos (*Pubmed, Embase y Scopus*) por presentar relación con la patogénesis de la periodontitis. La tabla muestra el número de genes implicados y el número de los 10 miARNs que habían sido seleccionados y que participan en cada proceso. De las rutas seleccionadas se ha anotado también el proceso biológico en el que estarían implicadas.

Tabla 17. Rutas KEGG para los miARNs sobre-expresados en los sujetos con periodontitis.				
	KEGG pathway	#genes	#miARNs	Proceso Biológico
1	ECM-receptor interaction	32	8	P. inflamatorio / Metabolismo óseo
2	Hippo signaling pathway	64	8	Metabolismo óseo
3	Adherens junction	40	8	P. inflamatorio / barrera epitelial
4	Fatty acid biosynthesis	6	7	P. inflamatorio / Metabolismo óseo
5	p53 signaling pathway	38	8	P. inflamatorio/ metabolismo celular (apoptosis).
6	Ubiquitin mediated proteolysis	64	8	Apoptosis /Metabolismo óseo.
7	FoxO signaling pathway	63	8	Estrés oxidativo / Metabolismo óseo
8	Focal adhesion	88	8	P. inflamatorio / barrera epitelial
9	Wnt signaling pathway	57	8	Metabolismo óseo
10	PI3K-Akt signaling pathway	128	8	P. inflamatorio/metabolismo celular
11	Bacterial invasion of epithelial cells	35	8	P. inflamatorio, invasión celular bacteriana
12	mTOR signaling pathway	30	8	Metabolismo óseo/ P inflamatorio/
13	HIF-1 signaling pathway	47	8	Metabolismo óseo / inflamatorio
14	Estrogen signaling pathway	39	8	Metabolismo óseo/inflamatorio
15	HTLV-I infection	97	8	Proceso inflamatorio/infección vírica
16	Apoptosis	35	8	Invasión bacteriana/P. inflamatorio
17	ErbB signaling pathway	35	8	Adhesión epitelial/P. inflamatorio
18	Prolactin signaling pathway	30	8	Metabolismo óseo
19	Sphingolipid signaling pathway	37	8	metabolismo lipídico/ óseo

<b>Tabla 17. Rutas KEGG para los miARNs sobre-expresados en los sujetos con periodontitis (Cont.)</b>			
	<b>KEGG pathway</b>	<b>#genes</b>	<b>#miARNs</b>
20	Progesterone-mediated oocyte maturation	46	8
21	Proteoglycans in cancer	90	8
22	Viral carcinogenesis	86	8
23	Prion diseases	9	7
24	Oocyte meiosis	55	8
25	Pathways in cancer	159	8
26	Colorectal cancer	36	8
27	Prostate cancer	46	8
28	Endometrial cancer	29	8
29	Central carbon metabolism in cancer	34	7
30	Renal cell carcinoma	33	7
31	Small cell lung cancer	43	8
32	Glioma	30	8
33	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	25	6
34	Non-small cell lung cancer	25	8
35	Pancreatic cancer	29	8
36	Acute myeloid leukemia	27	8
37	Chronic myeloid leukemia	31	8
38	Choline metabolism in cancer	42	8
39	Shigellosis	27	8
40	Proteoglycans in cancer	90	8
41	Viral carcinogenesis	86	8
42	RNA degradation	35	8
43	AMPK signaling pathway	53	8
44	Lysine degradation	22	8
45	Protein processing in endoplasmic reticulum	78	8
46	RNA transport	74	7
47	mRNA surveillance pathway	47	7
48	Toxoplasmosis	48	8
49	Amoebiasis	41	8
50	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	19	7

Utilizando el análisis ORA junto con el análisis manual realizado mediante la base de datos *DIANA-miRPath* encontramos las siguientes rutas KEGG que coincidían con las 19 rutas priorizadas: 1) Hippo signaling pathway, 2) Adherens junction, 3) p53 signaling pathway, 4) Ubiquitin mediated proteolysis, 5) FoxO signaling pathway, 6) Focal adhesion, 7) Wnt signaling pathway, 8) PI3K-Akt signaling pathway, 9) Bacterial invasion of epithelial cells, 10) mTOR signaling pathway, 11) HIF-1 signaling pathway, 12) Estrogen signaling pathway, 13) Apoptosis, 14) ErbB signaling pathway, 15) Prolactin signaling pathway, y 16) Sphingolipid signaling pathway.

En resumen, como respuesta al tercer objetivo planteado en esta tesis doctoral se seleccionaron 19 rutas biológicas en las que participaban los 10 miARNs considerados candidatos a marcadores de periodontitis. Estas rutas se implicaban en procesos relacionados con el metabolismo óseo, procesos inflamatorios, eventos de adhesión e invasión epitelial y estrés oxidativo, entre otros (rutas de la 1 a la 19 en la Tabla 17). Como se deduce de los resultados, 16 de las rutas identificadas por ORA coincidieron con las 19 rutas seleccionadas tras el estudio de *DIANA-miRPath*. Dado que estas rutas se ha visto que tienen relación con la etiopatogenia de la periodontitis son las que se discutirán en el siguiente apartado.

## **6.5. Resultados respecto al cuarto objetivo: Realizar una validación de los miARNs seleccionados**

### **6.5.1. Validación mediante RT-qPCR de miARNs en FCG**

Para la validación, se empleó una muestra distinta de cada uno de los individuos participantes en el estudio. En esta ocasión la muestra fue la primera toma de FCG de uno de los tres dientes diferente al escogido para la secuenciación y estudio de la expresión de miARNs. El resto de las muestras se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores estudios.

Se analizaron mediante Small-RNA-Seq un total de 23 muestras, 11 casos y 12 controles. Para el cálculo de los niveles de expresión relativa de cada miARN seleccionado se utilizó como control endógeno el hsa-miR-223-3p (assay ID 002295 Thermo Fisher Scientific) debido a que la expresión de dicho miARN resultó ser el más estable a nivel de conteo y umbral de ciclos (Ct) en los experimentos de NGS y RT-qPCR respectivamente. Se seleccionó este miR-223-3p teniendo en cuenta que obtuvo el número más elevado de lecturas por millón (cpm), y la menor desviación estándar y también dispersión a través de todas las muestras. Además, este miARN fue el más estable en todas las muestras con un

## Resultados

valor de cpm (conteo por millón de lecturas) igual a 17,25, una desviación estándar de 1,2 y una dispersión 1,85.

El método utilizado para el cálculo de la expresión relativa de los miARNs (logFC) fue  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  (método estadístico delta-deltaCt).

Según el p-valor, el resultado de la regresión logística (LASSO) y en función de su implicación en las rutas metabólicas, el estudio bioinformático seleccionó los siguientes miARNs:

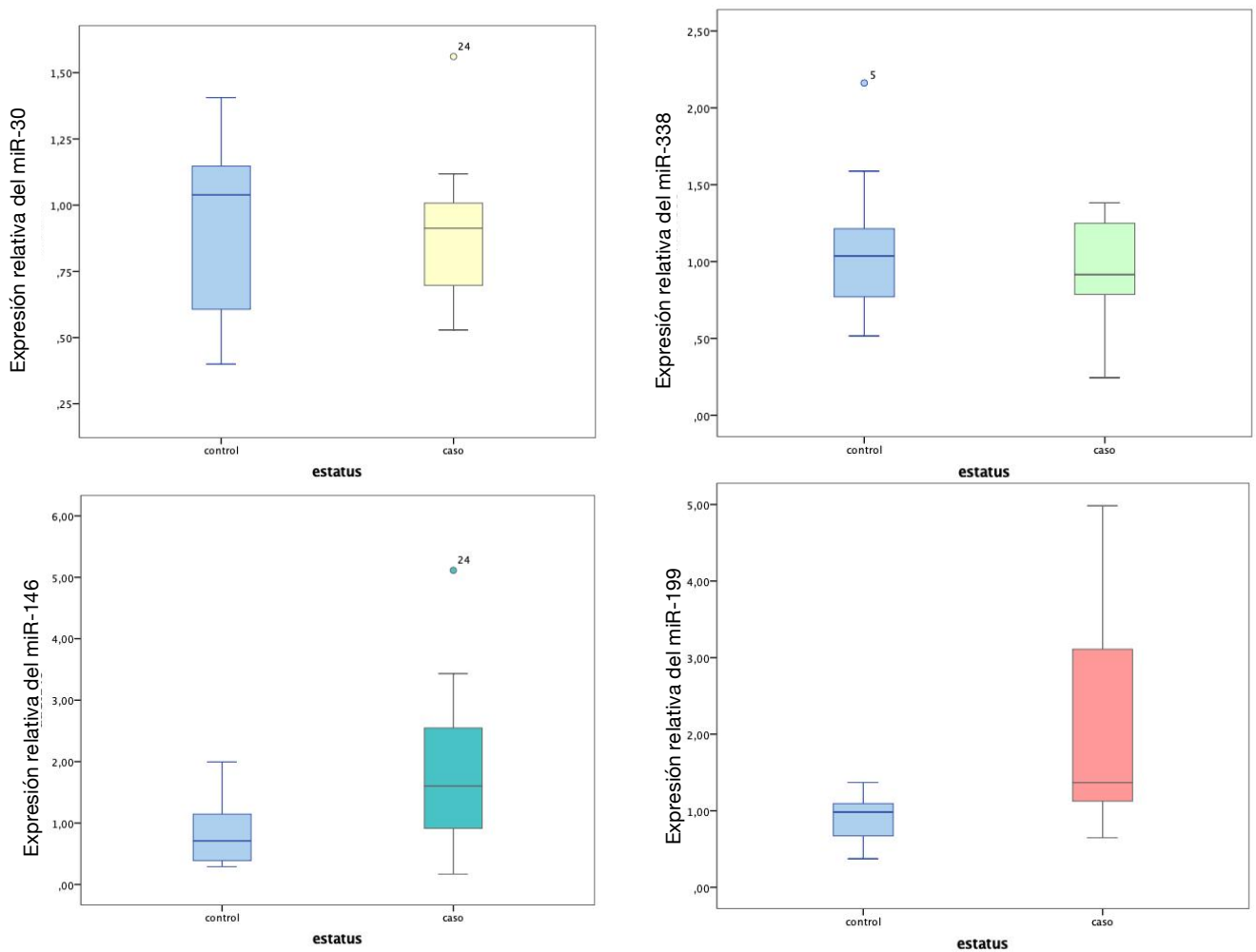
- ⊙ hsa-miR-30a-5p
- ⊙ hsa-miR-199a-3p
- ⊙ hsa-miR-338-5p

Además, también se eligió evaluar el hsa-miR-146a-5p (assay ID 000468 Thermo Fisher Scientific) aunque la expresión del miR-146a-5p no fue diferente entre grupos ( $p=0,355$ ). Se decidió escoger este miARN para su validación ya que algunos estudios realizados en tejidos periodontales habían destacado su expresión (Motedayyen y cols., 2015; Saito y cols., 2017; Radovic y cols. 2018). En el estudio realizado de smallRNA-seq su valor de fold change fue positivo, indicando una tendencia a tener más expresión en los pacientes que en los controles.

Los siguientes *boxplots* ilustran gráficamente la comparación de la expresión de estos miARNs en ambos grupos de estudio que fueron validados por la técnica de RT-qPCR (figura 30).

Los miARNs miR-146a-5p y miR-199b-3p se detectaron a niveles mas elevados en el FCG de los enfermos respecto a los controles de forma estadísticamente significativa. En el caso de los miARNs miR-30a-5p y miR-338-5p los niveles encontrados en ambos grupos fueron similares.





**Figura 30.** Niveles de expresión relativa de los miR-30, miR-338, miR-146 y miR-199 detectados en FCG de pacientes con periodontitis en comparación con sujetos sanos. El análisis de los niveles de miARNs se realizó mediante la técnica de RT-qPCR usando el ensayo TaqMan específico. Se aplicó el análisis (U de Mann-Whitney). Valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de los miR-146 y miR-199. Para los miR-30 y miR-338 no se encontraron diferencias entre grupos.

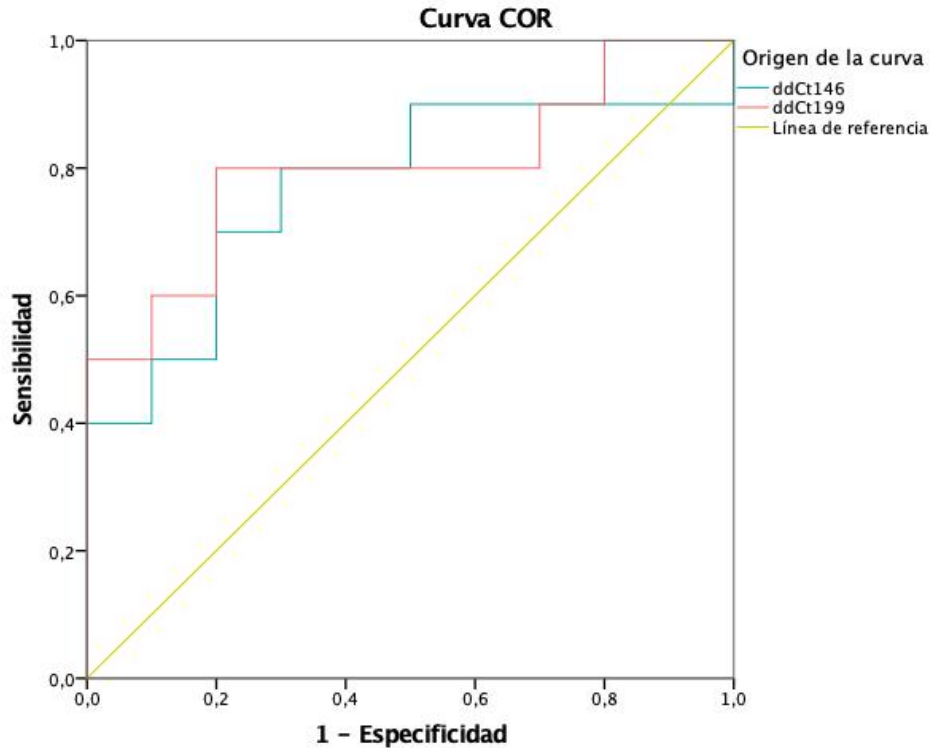
En la tabla 19 se recogen los valores medios de los niveles de expresión (FC) para cada miARN en los dos grupos de estudio, así como el p-valor del test estadístico utilizado para la comparación (U de Mann Whitney):

Tabla 19. Valores de niveles de expresión y p valor (U de Mann Whitney) de miARN validados			
miRNA	Casos (n=12) FC (DS)	Controles (n=12) FC (DS)	p
hsa-miR-30a-5p	0.99 (0.36)	0.96 (0.34)	n.s
hsa-miR-146a-5p	2.06 (1.43)	1.03 (0.80)	0,050
hsa-miR-199b(a)-3p	2.09 (1.59)	0.93 (0.31)	0,029
hsa-miR-338-5p	0.91 (0.33)	1.07 (0.45)	n.s

Con el fin de evaluar el potencial como biomarcador de diagnóstico de los dos miARNs expresados diferencialmente entre casos y controles, se procedió a la construcción y análisis de las correspondientes curvas ROC (Receiver Operating Characteristic). El análisis de dichas curvas se muestra en la siguiente tabla (Tabla 20):

Tabla 20. Análisis de curvas ROC para miR146a-5p y miR199b-3p.							
miRNA	AUC	Error estándar	IC 95%	p	Valor óptimo de corte para FC	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
hsa-miR-146a-5p	0,744	0.1120	0.528-0.959	0,050	1.22	72.7	72.7
hsa-miR-199b(a)-3p	0,782	0,107	0.572-0.992	0,029	1.11	80.0	72.7

Tal y como se desprende del análisis de las características de ambas curvas (Figura 31), el hsa-miR-199b-3p parece ser más potente como biomarcador de diagnóstico de periodontitis, obteniéndose mejores valores de AUC (área bajo la curva), sensibilidad y especificidad para el ensayo basado en el uso de miARNs en FCG para el diagnóstico de la periodontitis.



**Figura 31.** Gráfico que ilustra las curvas ROC de miR-146a-5p y miR-199b-3p

Por tanto, como respuesta al cuarto objetivo planteado se pudieron validar al repetir el experimento con unas muestras diferentes los miR-146a-5p y miR199b-3p como buenos biomarcadores para definir la periodontitis crónica avanzada en FCG.

## **6.6. Análisis adicional de correlación entre los niveles de fluido crevicular y los niveles de expresión de los miARNs validados.**

Para el análisis de correlación entre el nivel de expresión de los miARNs validados mediante la técnica de RT-qPCR y el volumen de FCG se empleó el coeficiente de correlación Rho de Spearman. Este análisis adicional reveló que los miR-199 y miR-146 presentaban una correlación positiva entre su nivel de expresión y el volumen de fluido crevicular gingival ( $p < 0,004$  y  $p < 0,027$  respectivamente). No se encontraron diferencias al analizar el nivel de expresión respecto al volumen de FCG para los miR-30 y miR-338.

Es decir, cuanto mayor era el volumen de fluido crevicular, la expresión de estos dos miARNs que se destacaban cómo buenos biomarcadores de periodontitis en el análisis de validación también aumentaba, lo que viene a reforzar el potencial de ambos miARNs como biomarcados en la enfermedad periodontal.

## 6.7. Análisis adicional específico para los controles 7 y 11

Como se ha observado en la figura 27 (diagrama de análisis de componentes principales o PCA), los controles 7 y 11 presentaban un agrupamiento en función de la expresión diferencial de los miARNs más similar a los casos que a los controles. El porcentaje de sangrado de estos sujetos (controles 7 y 11) era ligeramente superior al 25%. Consideramos que era interesante analizar el comportamiento de estos dos controles y decidimos no excluirlos teniendo en cuenta que en los dientes en los que se tomaban las muestras no existía ningún signo clínico de inflamación, es decir, no existía sangrado al sondaje.

Para los valores medios de las variables clínicas (porcentaje de sangrado, índice de placa, profundidad de sondaje, nivel clínico de inserción) existían diferencias significativas entre los controles 7 y 11 respecto a los casos ( $p < 0,005$ ) pero no respecto a los controles. Es decir, clínicamente podrían considerarse sujetos sanos. Por el tamaño reducido del grupo se realizaron los test ANOVA y Kruskal-Wallis.

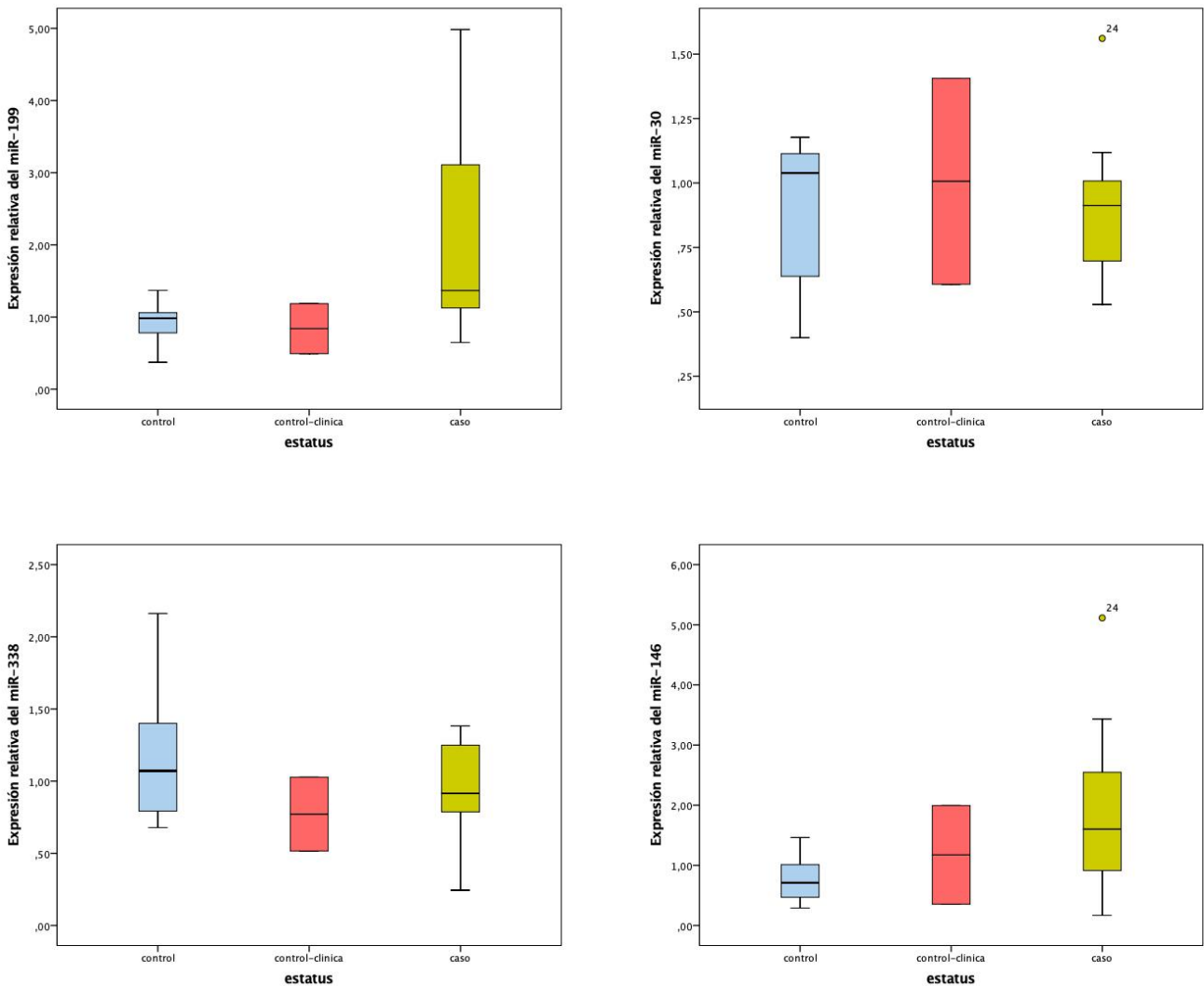
En este apartado se comparan los datos de secuenciación entre el grupo de controles y el grupo de controles 7 y 11. Se evidenciaron 401 miARNs diferencialmente expresados.

Entre los 401 miARNs diferencialmente expresados entre los controles y los controles 7 y 11, los valores de p y de FDR para los miARNs que se habían validado fueron los siguientes (Tabla 21):

Tabla 21. p valor y FDR de los miARNs validados en los controles 7 y 11.		
miARN	p valor	FDR
miR-146a-5p	$p=8.16 \cdot 10^{-4}$	FDR= $2.42 \cdot 10^{-3}$
miR-30a-5p	$p=1.96 \cdot 10^{-6}$ ,	FDR= $1.98 \cdot 10^{-5}$
miR-199b-3p	$p=4.27 \cdot 10^{-7}$	FDR= $5.88 \cdot 10^{-6}$
miR-338-5p	$p=6.89 \cdot 10^{-9}$	FDR= $1.6 \cdot 10^{-6}$

Con el fin de investigar los valores de expresión de los miARNs validados (miR-146a-5p, miR-199b-3p, miR-30a-5p y miR-338-5p) y detectar si estos miARNs podrían definir un estadio subclínico de periodontitis, se realizó una comparación de los niveles de expresión de los miARNs mediante RT-qPCR entre los tres grupos (controles, sanos y grupo de controles 7 y 11) para ver si se observaban diferencias estadísticamente significativas. En

este caso, el análisis comparativo mediante test ANOVA y correspondiente test post-hoc indicó que las diferencias entre los tres grupos no eran significativas para ninguno de los 4 miARNs, aunque el miR-146a-5p presentaba una tendencia hacia la sobreexpresión de este miARN. Esta tendencia es evidente en los gráficos siguientes (Figura 32).



**Figura 32.** Niveles de expresión relativa de miR-146, miR-199, miR-338, miR-30 detectados en FCG de pacientes con periodontitis en comparación con sujetos sanos. El análisis de los niveles de miARN se realizó mediante la técnica de RT-qPCR usando el ensayo TaqMan específico. Se aplicó ANOVA (U de Mann-Whitney). Existe una tendencia en el grupo de los controles 11 y 7 a expresar el miR-146 de forma diferente al resto de controles.



# DISCUSIÓN





## 7. DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó con el objetivo de identificar los miARNs que pudiesen encontrarse en muestras de FCG de pacientes con periodontitis crónica avanzada y en sujetos sanos. La aportación de la presente tesis es que realiza un “*Hight throughput screening*” o cribado de alto rendimiento de miARNs en el FCG. Hasta el momento no hay información sobre los miARNs que se pueden identificar en FCG. En el presente trabajo conseguimos secuenciar un 1,7% de miARNs.

De entre los cientos de miARNs encontrados en el FCG, la secuenciación pudo identificar 10 que presentaron una mayor expresión en sujetos enfermos y que resultó estadísticamente significativa. Se constató que los miARNs que se encontraban sobre-expresados en enfermos respecto a los sujetos sanos fueron: hsa-miR199a-3p; hsa-miR-199b-3p; hsa-miR-338-5p; hsa-miR-374b-5p; hsa-miR-30a-5p; hsa-miR-375; hsa-miR-3648; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-4492 y hsa-miR-149-5p.

Se estudió qué miARNs resultaban más adecuados para identificar a los sujetos con periodontitis. Después de la selección de los miARNs en función de su resultado en el análisis bioinformático y su implicación en rutas moleculares KEGG relacionadas con la patogénesis de la periodontitis, se eligieron cuatro miARNs: hsa-miR-30a-5p; hsa-miR-146a-5p; hsa-miR-199b-3p; hsa-miR-338-5p.

Por último, en el análisis de validación realizado sobre FCG de distintos dientes de los mismos individuos de la muestra de sujetos manejada en el resto de la tesis, se planteó que el hsa-miR-199b-3p y el hsa-miR-146a-5p pueden ser buenos biomarcadores de periodontitis crónica avanzada.

Estudiar este tipo de marcadores epigenéticos en el FCG es un campo muy novedoso que puede ayudar a ajustar y precisar mejor el modelo etiopatogénico de la periodontitis. Con los resultados de esta tesis se abren nuevas vías de investigación, y además se plantea la posibilidad del uso de los miARNs para el diagnóstico precoz sobre la susceptibilidad a la periodontitis, aclarar la interrelación entre la patología periodontal y sistémica, e incluso servir de modelo de estudio para otras patologías inmuno-inflamatorias sistémicas.

## **7.1. Discusión de la metodología utilizada en el estudio y limitaciones del estudio**

### **7.1.1. Tipo de estudio**

Para el grupo de investigación de la Unidad de Periodoncia de la UV, este estudio de casos y controles significa una primera aproximación a la línea de investigación que se está desarrollando sobre marcadores epigenéticos, específicamente la aplicación de los miARNs como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en el campo de la periodoncia. El trabajo de esta investigación nos ha servido para el desarrollo de un protocolo exhaustivo en la toma y procesado del FCG para su posterior análisis. La metodología empleada fue estricta, y la parte de laboratorio y bioestadística se desarrolló en colaboración con el grupo de investigación dirigido por el Dr. José Luis García del Departamento de Fisiología de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València, que son expertos en el análisis de mecanismos epigenéticos implicados en la etiología de las enfermedades humanas así como en la identificación de biomarcadores epigenéticos.

Antes de comenzar la presente investigación se desarrolló un estudio piloto con el objetivo de analizar si era posible la detección de miARNs en el FCG (Micó y cols., 2018). Hasta ese momento no había información al respecto, no existían publicaciones en la literatura que analizaran la presencia y el papel de los miARNs en FCG. En 2017 se publicó el primer estudio que detectó miARNs en FCG (Saito y cols., 2017).

### **7.1.2. Muestra del estudio**

Para seleccionar a los sujetos del grupo de enfermos, se empleó la clasificación de Armitage de 1999 vigente en el momento (curso académico 2016-2017). No se aplicó la nueva clasificación de Tonetti y cols., 2018 publicada más tarde porque la reconversión podría resultar imprecisa, aunque por lo general los casos se incluirían como periodontitis estadios III y IV grados A y B.

Hasta la publicación de la nueva clasificación (Tonetti y cols., 2018), no se había definido estrictamente la situación de salud periodontal a nivel clínico. Por ello, para esta investigación se decidió definir al individuo sano como aquel que no presentase pérdida de inserción ni profundidad de sondaje superior a 3 milímetros con un porcentaje de

sangrado al sondaje de menos del 25%. La nueva clasificación considera que la presencia de sangrado al sondaje superior al 10% de las localizaciones puede ser definida como gingivitis localizada y si es superior al 30% se define como gingivitis generalizada. Si bien la mayoría de controles sanos de nuestra muestra presentaban porcentajes de sangrado inferiores al 10%, dos sujetos del grupo control tenían porcentajes mayores, y según la nueva clasificación deberían diagnosticarse como gingivitis localizadas. Sin embargo, y debido a que los criterios de inclusión se referían a la clasificación de 1999 y sumado a que las tomas de FCG en sujetos sanos se realizaban en dientes sin inflamación gingival ni sangrado al sondaje ni pérdida de inserción, se decidió no dejar fuera del análisis a ningún individuo.

A la hora de seleccionar los sujetos que cumplieren con los criterios de inclusión nos encontramos con especiales dificultades para encontrar pacientes con periodontitis crónicas generalizadas avanzadas, con bolsas  $\geq 6\text{mm}$  de profundidad en dientes uniradiculares; y además los pacientes no debían ser fumadores de más de 10 cigarrillos o tener otros problemas de salud asociados. Por esto, a pesar de que el tamaño muestral es pequeño, completar la selección y la toma de la muestra de FCG llevó más de un año.

La muestra final de 11 casos y 12 controles, es una de las más importantes limitaciones de este estudio, pero hasta ese momento no existían datos en publicaciones anteriores que nos orientasen sobre un correcto cálculo del tamaño muestral. Es cierto que con este tamaño muestral y tras realizar una regresión por sexo y con un nivel de significatividad  $p < 0,005$  y un intervalo de confianza o FDR  $< 0,05$  (99,95%) se encontraron más de 10 miARNs que se expresaban de forma diferencial en ambos grupos. Es decir, que el tamaño muestral fue suficiente para hallar resultados significativos. Al analizar la potencia del estudio con esta muestra el resultado del análisis post-hoc fue del 66% para el miR-146a y del 76% para el miR-199b. Adicionalmente, se calculó la muestra necesaria para alcanzar una potencia del 80% y 90% y los resultados fueron:

- miARN-146a-5p: para una potencia del 80% se necesitarían 36 sujetos de estudio (18 por grupo); y para una potencia del 90% se necesitarían 48 sujetos de estudio (24 por grupo).
- miARN-199b-3p: para una potencia del 80% se necesitarían 28 sujetos de estudio (14 por grupo); y para una potencia del 90% se necesitarían 38 sujetos de estudio (19 por grupo).

Por tanto, sabemos que para nuevas investigaciones sería necesario reclutar al menos 36 sujetos, ya que se tendría en cuenta el miARN que tiene la menor potencia para establecer el mínimo número de participantes en el estudio.

Otro de los factores condicionantes del tamaño muestral fue el material y método empleado en este estudio el cual supone el empleo de recursos personales, físicos y económicos muy elevados.

Para la selección de los dientes en los que se iban a tomar la muestra de FCG, se eligieron dientes uniradiculares para ambos grupos. Se tomaron 3 muestras de 3 dientes uniradiculares diferentes. De este modo, se pretendía controlar la muestra excluyendo posibles factores de riesgo local a la periodontitis, como una anatomía radicular más compleja o una mayor dificultad al control de placa bacteriana.

### **7.1.3. Homogeneidad de los grupos**

Tanto para la selección de los individuos pertenecientes al grupo control como al grupo de enfermos no existían diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros que se establecieron como criterios de homogeneidad. Se consiguió uniformidad en ambos grupos en todos los parámetros descriptivos de la muestra.

Existía homogeneidad entre los dos grupos en todas las variables demográficas, sin embargo, como era de esperar, los dos grupos fueron completamente diferentes al comparar las variables clínicas que les definían. El grupo de sanos presentaba valores medios de nivel clínico de inserción, de índices de placa y porcentajes de sangrado que se acotaban dentro de los criterios establecidos, mientras que en el grupo de periodontitis estas mismas variables definían un estado avanzado de la enfermedad.

En ambos grupos el porcentaje de mujeres fue superior al de hombres. El porcentaje de hombres para el grupo de sanos fue del 33,3% y para el grupo de enfermos del 27,3%, mientras que el porcentaje de mujeres fue del 66,7% en el grupo de sanos y 72,7% en el grupo de enfermos. Las muestras fueron homogéneas en cuanto al sexo ( $p=0,765$ ). Antes de seleccionar por secuenciación los miARNs candidatos para la validación, el análisis informático realizó un análisis de regresión logística en función de los diferentes parámetros que se midieron clínicamente. Únicamente se obtuvieron resultados ligeramente diferentes al realizar la regresión por sexo. Por ello, y teniendo en cuenta que el número de mujeres era mayor en ambos grupos, se decidió escoger los miARNs que

Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada resultaron tener expresión diferencial significativa tras realizar la corrección con la co-variable del sexo.

La edad podría ser un factor importante en cuanto a condicionar mecanismos epigenéticos favorables al desarrollo de periodontitis. Aunque un buen número de autores opinan que la edad parece ser un factor de acontecimientos patogénicos periodontales acumulados a lo largo de la vida del individuo, algunos trabajos publicados apoyan la idea de que la edad en sí misma es un factor de riesgo directamente relacionado con la progresión de periodontitis (Carasol y cols., 2016).

Por lo tanto, al acotar el rango de edad en la selección de la muestra se podrían evitar posibles sesgos derivados de la influencia de la edad en los niveles de estos marcadores. Por estos motivos, se decidió acotar la edad de los sujetos del estudio de 30 a 60 años.

#### **7.1.4. Toma de FCG**

El volumen de FCG es un parámetro que normalmente sólo se emplea en estudios de investigación. Sin embargo, se piensa que podría aplicarse como un parámetro clínico que al analizar su composición podría ser uno de los primeros datos para poder definir un estadio subclínico de la patología periodontal (Attström, 1970; Griffiths, 2003). En presencia de inflamación, el volumen del FCG aumenta y también se produce un cambio importante a nivel de sus componentes (Cimasoni, 1983; Pöllanen y cols., 2003; Griffiths, 2003).

Es muy importante tener en cuenta la evaporación y realizar el proceso de lectura de tira de papel y transporte para su almacenaje lo más rápido posible (Griffiths, 2003). El protocolo de toma de muestra se siguió de manera estricta. Inmediatamente después de la toma de FCG con la tira de papel, esta se colocó en el Periotron®. Tras los 16 segundos de lectura, se almacenó en un tubo *ependorf* y se guardó inmediatamente en un congelador -20°C. No pasaron en ningún caso más de 45 segundos desde la toma de muestra hasta el almacenado en este primer congelador. Acabado el muestreo en los tres dientes, se trasladaron inmediatamente todas las muestras a un segundo congelador a -80°C donde quedaban almacenadas.

Como es de esperar, en estos pacientes con periodontitis avanzada, no fumadores o fumadores de menos de 10 cigarrillos, en la que se tomaban las muestras de zonas con profundidad de sondaje  $\geq 6$ mm, existía un alto grado inflamatorio. Al introducir un periopaper hasta encontrar resistencia, la contaminación hemática del periopaper supuso

otra dificultad añadida. Se tuvieron que excluir varias muestras por contaminación hemática y dos sujetos válidos para el estudio se descartaron por ser imposible la toma de muestras debido al sangrado. Aunque no existe evidencia científica sobre la posibilidad de liberación de miARNs consecuencia de la rotura de eritrocitos, dicha liberación podría alterar el perfil de miARNs circulantes (Blondal y cols., 2013).

Algunos autores (Løe y Holm-Pedersen, 1965), apuntan que la recolección de FCG con periopapers introducidos en el surco puede estimular la inflamación. Sin embargo, tal y cómo se explica en el apartado de la búsqueda bibliográfica, todos los métodos existentes presentan inconvenientes y algunos incluso no permiten el posterior análisis del FCG en el laboratorio.

La técnica de la tira de papel absorbente es una técnica rápida sin alteración en la muestra de FCG para permitir el posterior análisis en el laboratorio. La tira de papel debe introducirse suavemente hasta notar una ligera resistencia, en ese momento, no se debe ejercer mas presión. Como limitaciones, destaca la incapacidad del Periotron® para medir volúmenes mayores a 2 µl. A pesar de que las tiras de papel pueden absorber más de este volumen (Griffiths, 2003), la lectura de unidades Periotron se satura. Esto es importante porque habitualmente, las zonas con mayor inflamación pueden aparecer volúmenes elevados de FCG que el periotron no puede llegar a medir.

Se tomaron 3 muestras por diente, de 3 dientes distintos. Aunque en esta investigación únicamente se empleo la primera de las tomas, hay que tener en cuenta que las tomas repetidas siguientes podrían provocar alguna modificación a nivel cuanti/cualitativo. Sin embargo, no existen datos en la literatura sobre la influencia a este nivel del efecto de reiteradas tomas en la misma localización el mismo día del estudio.

En cuanto al volumen de FCG, los valores obtenidos apenas sufrían variación de una toma a otra, por lo que parece ser que el volumen no varía con tomas repetidas en FCG en la misma localización. Sería interesante no obstante estudiar si estas tomas repetidas pueden influir realmente en la composición y el volumen del FCG.

## **7.2. Discusión de los resultados**

### **7.2.1. Discusión de los resultados al primer objetivo planteado en esta Tesis Doctoral: Secuenciar mediante la técnica de SmallRNA-seq (Next Generation Sequencing) todos los miARNs presentes en el FCG de sujetos sanos y pacientes con periodontitis crónica avanzada**

El protocolo de extracción de miARNs, la construcción de las librerías, la medición de la calidad, la secuenciación y el estudio bioestadístico fueron realizados en colaboración con el equipo técnico y de la Unidad de Bioestadística y Diagnóstico Computacional de *Epidisease SL*.

Tras la desadsorción y extracción de los ARNs adsorbidos por el peripaper, se midió la cantidad y calidad del ARN extraído tal y como se ha especificado en el apartado de material y métodos. Tras una primera verificación y eliminación de las muestras con baja calidad, se procedió a un segundo análisis en el que se confirmaba mediante métodos bioestadísticos que la calidad de las secuencias obtenidas en el proceso de SmallRNA-Seq era adecuada.

Se obtuvo una gráfica que mostraba las calidades de lectura, obteniendo una Phred alta (media > 32), lo cual quiere decir que al nombrar las bases existe una probabilidad del 99,9% de que se identifiquen correctamente (Figura 24). En los estudios publicados hasta la fecha que analizan miARNs en FCG (Saito y cols., 2017; Radovic y cols. 2018) no se especifica el método utilizado para la comprobación de la calidad de las muestras.

Cada una de las muestras con los criterios de calidad superados, se alineó con el genoma humano GRCh38/hg38 y se midió el número de lecturas que correspondían a cada uno de los miARNs que podían identificarse.

La importancia de nuestro estudio radica en que por primera vez se ha realizado secuenciación masiva (NGS) SmallRNA-seq de miARNs obtenidos del FCG de pacientes con periodontitis. En el presente trabajo conseguimos secuenciar un 1,7% de miARNs del FCG.

La generación de librerías permite disponer de una cantidad finita y acotada de los miARNs que aparecen en FCG, tanto de pacientes con periodontitis crónicas avanzadas como de individuos periodontalmente sanos. La ventaja que aportan estos conocimientos para las futuras investigaciones, es disponer de este biorepositorio concreto de miARNs tanto en FCG de sujetos con la patología como con sujetos sanos que permitirá escoger los miARNs más adecuados en función de los marcadores que interese investigar, bien

sea a nivel local (patología periodontal) o quizás incluso a nivel sistémico para estudiar la relación de la periodontitis con otros procesos patológicos u otros trastornos inmuno-inflamatorios, oncológicos etc.

### **7.2.2. Discusión de los resultados respecto al segundo objetivo: Estudiar la expresión de los miARNs en pacientes con periodontitis crónica avanzada y sujetos sanos**

Se emplearon métodos de expresión diferencial, análisis de componentes principales, clustering y clasificación de los miARNs teniendo en cuenta las variables que caracterizaban a cada muestra. Se evaluaron los valores de expresión diferencial y se seleccionaron los miARNs considerando la implicación que tenían en el control de genes clave en las rutas metabólicas en las que intervenían.

La expresión de los miARNs en los pacientes de periodontitis, fue muy similar y bastante homogénea en todos los casos tal y como se observa en el análisis de componentes principales (Figura 26). Los controles, en cambio, presentaron una expresión de miARNs más dispersa, pero claramente diferenciada de los enfermos.

Dos de los controles presentaron una expresión de miARNs diferente al resto de los sanos, de hecho en el análisis de componentes principales, estas dos muestras correspondientes al control 7 y el control 11, aparecieron más cercanos al grupo de muestras de los enfermos. Cuando se calculó el porcentaje de sangrado en estos dos controles (Control 7 y 11) se pudo ver que era ligeramente superior al 25 %, pero como el paciente no presentaba pérdida de inserción ni presencia de bolsas, y la muestra se había tomado en un diente sin pérdida de inserción, ni profundidades de sondaje >3mm y por supuesto sin sangrado al sondaje, se consideró interesante analizar como esta situación de inflamación gingival en otros dientes podía repercutir en los valores de los miARNs en dientes que se consideraban totalmente sanos. Es decir, se pensó que sería muy interesante analizar cómo estos marcadores podían reflejar una situación subclínica de inflamación gingival o un estado de susceptibilidad a la periodontitis.

Como consecuencia de estos hallazgos, se realizó un estudio estadístico creando un nuevo grupo compuesto por esos dos controles. Entre los 401 miARNs diferencialmente expresados entre los controles y los casos, en los controles 7 y 11 se encontraban los miARNs que se validaron. Es decir, de los datos de secuenciación se desprende que los



miARNs que validamos se expresan de forma diferencial entre los controles 7 y 11 y el resto de los controles. La expresión del miR-146a-5p se incrementaba si aumentaba el porcentaje de sangrado al sondaje, aunque esos cambios no fueron estadísticamente significativos. La interpretación que se podría hacer de este resultado es que el grado inflamatorio sub-clínico, podría expresarse a través de estos marcadores epigenéticos.

Sin embargo, no hay que olvidar que solo dos sujetos con un porcentaje de sangrado ligeramente superior al 25% y sin signos clínicos de periodontitis conforman este tercer grupo, siendo por tanto un tamaño muestral muy pequeño. Quizá este hecho sea el que limite alcanzar la significatividad en los resultados. De cualquier forma y debido a la importancia de estos datos, sería interesante estudiar la expresión de estos miARNs en un tamaño muestral mayor de sujetos con inflamación gingival leve y sin pérdida de inserción con el objetivo de intentar valorar la utilidad de estos marcadores para predecir el grado de susceptibilidad o riesgo de progresión de periodontitis. Es posible que se pudiesen detectar marcadores que nos permitiesen realizar un diagnóstico precoz de un sujeto con alta susceptibilidad a la periodontitis y quizás así poder evitar las secuelas de las enfermedades periodontales implementando un control y tratamiento temprano.

#### **7.2.2.1. Estudios sobre mecanismos epigenéticos en biopsias gingivales con periodontitis**

Si se revisan las publicaciones en las diferentes bases de datos, se puede establecer que la investigación en marcadores epigenéticos es cada vez mas amplia en medicina, pero en el campo de la odontología y más concretamente de la periodoncia, prácticamente no existen datos. Se realizó una revisión sistemática publicada en la revista *Medicina Oral, Patología Oral, Cirugía Bucal* (Almiñana-Pastor y cols., 2019), con el objetivo de identificar y sintetizar los estudios realizados hasta ese momento (mayo 2019). En la mayoría de los trabajos publicados, se tomaban biopsias de tejidos gingivales para estudiar los distintos factores epigenéticos que pudieran estar relacionados con la periodontitis.

El mecanismo epigenético más estudiado fue la metilación del ADN. Aunque los resultados entre los distintos estudios son contradictorios, los autores sugieren una tendencia a un patrón de hipometilación en regiones promotoras de genes relacionados con la síntesis de moléculas proinflamatorias como la IL-8, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ , e IL-17 (Andia y cols., 2010; Stefani y cols., 2013; Zhang y cols., 2010b; Viana y cols., 2011; Schulz y cols., 2016; De Souza y cols., 2014). La hipometilación llevaría a la sobre-expresión de

ciertos genes y consecuentemente a un aumento de estas moléculas proinflamatorias, lo que supondría una respuesta inmuno-inflamatoria posiblemente exagerada frente a las bacterias periodonto-patógenas.

Por el contrario, otros estudios señalan un patrón hiper-metilado para genes implicados en la síntesis de COX2, PGE2, E-Cadherina y TNF $\alpha$  (Loo y cols., 2010; Zhang y cols., 2010; Zang y cols., 2013). Otros trabajos como los de De Oliveria y cols. (2011) y De Faria Amormino y cols. (2013), encontraron un estado hiper-metilado para los genes que codifican algunos *TLR* (Receptores Tipo Toll), iniciadores de la cascada de señalización inflamatoria y sitio de unión importante para la activación de NF- $\kappa$ B, potente iniciador de la respuesta inflamatoria y pérdida ósea. Se observó hiper-metilación en *SOCS1* y *LINE1* en tejidos afectados de periodontitis (Baptista y cols., 2014). Los genes *SOCS1* (suppressor of cytokine signalling) y *LINE1* (long interspersed nuclear elements) son genes con alta densidad de regiones promotoras CpG (regiones ricas en Citosina y Guanina) y por tanto con una gran influencia en su transcripción a nivel epigenético en la regulación de vías inmuno-inflamatorias.

En este último contexto, algunos autores sugieren qué en lesiones avanzadas de periodontitis, se produce un estado de “nuevo equilibrio” con niveles bajos de estas citocinas, lo que sugieren que evita que la progresión de la pérdida de soporte se produzca de forma rápida fomentándose más bien la cronificación de la lesión (Zhong y cols., 2007). Es habitual observar como lesiones periodontales avanzadas con profundidades de sondaje > 6mm, pueden estar sin progresar durante un periodo relativamente largo de tiempo, y esto posiblemente no podría suceder si no existiese un mecanismo regulador que frenase la respuesta inmuno-inflamatoria del individuo. Este mecanismo moderador podría estar asociado a la intervención de factores de tipo epigenético.

En cuanto al papel de los miARNs en la patología de la periodontitis, los resultados de la revisión sistemática citada en el apartado de introducción de esta tesis, mostraron que algunos miARNs detectados en muestras de biopsias de tejidos gingivales, destacaban por su sobre-expresión significativa en los casos de periodontitis. El miARN 146a-5p, se vió sobre-expresado de forma significativa en tejidos con periodontitis en diferentes trabajos independientes (Motedayyen y cols., 2015; Radovic y cols., 2018; Kadkhodazadeh y cols., 2013; Xie y cols., 2011). Otros miARNs que también aparecían sobre-expresados en otras publicaciones en los casos de periodontitis fueron los miARNs: miR-499, miR-22, miR-103, miR-106b, miR-203, miR-223, miR-301a, miR-199b, miR-1226, miR- miR-30e, miR-150, miR-200b, miR-155 (Lee y cols., 2011; Stoecklin-Wasmer y

Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada cols., 2011; Perri y cols., 2012; Ogata y cols., 2014; Micó y cols., 2018). Todos ellos aparecen implicados en procesos relacionados con la inflamación, el metabolismo óseo, el ciclo celular, la apoptosis celular y procesos oncológicos. La compleja regulación que estos miARNs tienen en las diferentes vías moleculares y las consecuencias de su sobre- o infra- expresión en la transcripción de un gran número de genes, solo permite de momento plantear hipótesis sobre posibles relaciones de estos marcadores con las distintas patologías a estudiar.

### **7.2.2.2. Estudios previos de miARNs en FCG**

Siguiendo con la discusión centrada en la expresión de los miARNs en FCG de la presente tesis doctoral, en este sub-apartado se discuten los estudios previamente publicados que analizan la presencia y expresión de miARNs en el FCG.

Los marcadores epigenéticos y en concreto los miARNs, presentan un gran dinamismo en la biología celular. Es decir, permiten controlar la expresión de los genes en función de algún cambio ambiental que se haya producido en el entorno celular externo. Frente a los marcadores genéticos, que reflejan más bien una condición estática, los marcadores epigenéticos se podrían postular como marcadores más adecuados para el estudio de un acontecimiento dinámico-evolutivo y cambiante en el tiempo como es el proceso de enfermedad y así contribuir no solo al diagnóstico, sino también pronóstico, tratamiento y seguimiento del caso.

Para que un biomarcador sea beneficioso en la práctica clínica en primer lugar, debe poderse detectar mediante un método validado, económico, que sea factible en un laboratorio de diagnóstico clínico y a ser posible que el biomarcador a detectar se obtenga mediante un método poco invasivo. La toma de muestra en el FCG y el análisis de los miARNs en este tipo de muestra cumple estos requisitos.

Nuestro grupo de investigación de la Unidad de Periodoncia de la *Universitat de València*, empezó a trabajar en el protocolo de estudio de esta tesis en 2016 con el objetivo de valorar la presencia de estas moléculas (miARNs) y su posible utilidad como biomarcadores epigenéticos de la periodontitis en FCG. En primer lugar, se llevó a cabo un estudio piloto en el que se seleccionaron para estudiar miARNs detectados en estudios previos relacionados con el metabolismo óseo, concretamente miARNs que participaban en la regulación Wnt/B-catenina y la regulación de la expresión de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) (García-Gimenez y cols., 2016). Este estudio piloto permitió

confirmar la detección de miARNs en el FCG. Concretamente se encontraron seis tipos de miARNs: miR-671, miR-122, miR-1306, miR-27a, miR-223, miR-1226 pero solo este último mostró diferencias llamativas entre sanos y enfermos. (Micó y cols., 2018). Este estudio piloto nos fue útil para constatar la posibilidad de encontrar miARNs en el FCG, y para estudiar, protocolarizar y mejorar la metodología que se ha seguido en esta tesis.

### **Comparación de resultados con el estudio de Saito y cols., en 2017**

Saito y cols., en 2017 llevaron a cabo un estudio en el que realizaban un cribado en FCG en dos fases. Durante la primera fase, se seleccionaron 8 sujetos de estudio, 2 pacientes con periodontitis crónica, 1 con periodontitis agresiva y 5 sujetos sanos. A través de un panel de PCR prediseñado buscaban la presencia en FCG de 752 miARNs. Estos autores fueron los primeros en observar que los pacientes con periodontitis presentaban unos perfiles de miARNs distintos a los sujetos sanos.

En la segunda fase del estudio, seleccionaron a 12 sujetos, 5 con periodontitis crónica, 1 con periodontitis agresiva y 6 sanos. Seleccionaron 40 miARNs de los 752 del panel prediseñado en función de la expresión, y buscaron confirmar su expresión a través de PCR en esta nueva muestra de sujetos. Observaron que en ambas muestras los patrones se repetían con 19 miARNs sobre-expresados y 21 infra-expresados. Este grupo analizó a través del software mirPath posibles rutas metabólicas diana de estos miARNs pero tras su elección y no como paso previo a seleccionar los miARNs.

Si se discute este trabajo de Saito y cols., 2017, se debe mencionar que el cribado inicial de miARNs lo realizan con un tamaño muestral muy pequeño, 2 pacientes con periodontitis crónica y uno con periodontitis agresiva. Posteriormente, los autores seleccionaron 5 pacientes con periodontitis crónica y uno con agresiva para validar los resultados. En este sentido, validar estos resultados previos empleando dos grupos de sujetos con patología crónica y agresiva creemos que podría no ser adecuado por la diferente idiosincrasia de cada patología y sabiendo que no tenemos información al respecto sobre la expresión de estos miARNs. Además, uno de los grupos, periodontitis agresiva, estaría formado por un único individuo.

En esta tesis doctoral realizamos un *screening* masivo por tecnología NGS mediante un estudio de SmallRNA-seq en 11 pacientes con periodontitis crónica avanzada y en 12 controles sanos. La inclusión de pacientes con perfiles de patología agresiva, o de rápida progresión, como apunta el estudio de Saito y cols. 2017, resulta muy interesante, pero hay que recordar, que existen multitud de factores de riesgo que pueden relacionarse con

una rápida progresión que podría afectar a la expresión de los miARNs y que no fueron tenidos en cuenta. Tampoco se especifica si en el momento del muestreo del FCG los pacientes habían sido tratados con anterioridad, o si la periodontitis estaba silente o activa. En nuestro trabajo se decidió incluir dos grupos de individuos con situaciones extremas, uno con periodontitis avanzada no tratada y otro de individuos estrictamente sanos.

En cuanto al método empleado, en el artículo de Saito y cols., de 2017 emplearon un panel de PCR prediseñado (Exiqon) con el objetivo de realizar un cribado de 752 miARNs (*Ready-to-Use miRNA PCR panel*); mientras que en nuestro estudio realizamos una secuenciación de ARN de cadena corta (SmallRNA-seq), que permite evaluar todos los miARNs que están identificados en la actualidad (más de 2.000). De este modo, se buscó detectar cualquiera de los miARNs catalogados en la base miRBase v7.0 que pudieran existir en el FCG. No hay ninguna coincidencia entre los miARNs sobreexpresados encontrados por Saito y cols. y los encontrados en esta tesis, tampoco hay concordancia con los miARNs encontrados en el trabajo de Micó y cols. (2018). Creemos que el no realizar una búsqueda masiva y simplemente escoger los miARNs que aparecen en otras patologías diferentes a la periodontitis, puede dejar fuera miARNs que en FCG pueden tener una mayor relación con el proceso de la periodontitis.

Al valorar las rutas escogidas para seleccionar miARNs según vías moleculares KEGG, sólo coincidimos con Saito y cols. (2017) en las vías de señalización hippo (hsa04390) y FoxO (hsa04068). Estos autores incluyen otras vías (relacionadas con procesos oncológicos) que aparentemente no guardan relación con el proceso patogénico de la periodontitis. De los 10 miARNs sobre-expresados en sujetos con periodontitis de esta tesis, todos estaban implicados en la regulación de genes participantes en vías moleculares de demostrada evidencia de asociación con las vías responsables de la patogénesis de la periodontitis (procesos inflamatorios y del metabolismo óseo). En esta tesis al buscar entre todos los miARNs descritos hasta el momento aquellos que mejor definían la periodontitis, se pudo ver que efectivamente estos miARNs participaban en procesos relacionados con el desarrollo de la periodontitis. Es decir, al no existir datos al respecto, la mejor opción en nuestra opinión es empezar el proceso de búsqueda no dirigida de miARNs candidatos que puedan explicar los mecanismos moleculares relacionados con la periodontitis, por este motivo se decidió realizar la secuenciación masiva de todos los miARNs que se podrían encontrar en FCG, y la selección de aquellos que mejor definiesen la enfermedad.

### **Comparación de resultados con el estudio de Radovic y cols. 2018**

En 2018, Radovic y cols., estudiaron la expresión del miR-155 y miR-146a en FCG de pacientes con periodontitis con y sin padecer diabetes.

Observaron una sobre-expresión de los dos miARNs (miR-146a y miR-155) tanto en pacientes con periodontitis y diabetes como sin diabetes. Sin embargo, seis semanas después de realizado el tratamiento periodontal básico, vieron que los niveles de ambos miARNs se redujeron a niveles comparables en los dos grupos. El análisis multivariable de este estudio reveló que los niveles de miR-146a y miR-155 estaban significativamente asociados con la periodontitis tras ajustar los resultados por edad y género antes y después del tratamiento (Radovic y cols., 2018).

Al contrario, en el presente estudio se realizó una secuenciación masiva por NGS y se identificaron hasta ciento cuarenta y ocho miARNs, de los cuáles 19 mostraron tener una expresión diferencial significativa entre el grupo de pacientes con periodontitis y los sujetos sanos. Tras realizar el análisis bioinformático se vio que únicamente al ajustar por la variable sexo se obtenían resultados ligeramente distintos. Finalmente fueron diez miARNs los que se vieron sobre-expresados en los sujetos con periodontitis (miR-149-5p, miR-4492, miR-29b-3p, miR-3648, miR-338-5p, miR-199a-3p, miR-199b-3p, miR-30a-5p, miR-347b-5p, miR-375).

En función del resultado de la regresión logística por método LASSO se seleccionaron los 3 miARNs (hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-199a-3p y hsa-miR-338-5p) con una mayor potencia de expresión para su validación en otras muestras independientes mediante la técnica de RT-qPCR tal y como se había descrito en el apartado de materiales y métodos.

Ninguno de los miARNs coincidió con los seleccionados por Radovic y cols., 2018, pero obviamente de nuevo, al no realizar una búsqueda masiva de miARNs en FCG, y seleccionar únicamente aquellos que cabría esperar aumentados por su implicación en genes relacionados con procesos inmuno-inflamatorios, quedan fuera múltiples miARNs que en FCG podrían ser más adecuados para definir el estado de periodontitis.

Aún así y tomando en consideración una de nuestras limitaciones que es el tamaño muestral se decidió incluir para la validación al miR-146a-5p, un *inflamamir* que se ha evaluado en múltiples estudios que analizaban la relación entre miARNs y periodontitis tanto en biopsias gingivales como en FCG (Motedayyen y cols., 2015; Saito y cols., 2017; Radovic y cols. 2018).

Finalmente, la validación en muestras distintas de FCG de los miARNs que se sobre-expresaban en nuestro estudio presentó al miARN miR-199b-3p y al miR-146a-5p como buenos marcadores de periodontitis, con una especificidad y sensibilidad en torno al 80%. Sorprendentemente, aunque el miR-146a-5p no se mostraba como uno de los miARNs más significativos resultó expresarse de forma significativa al realizar la validación en otras muestras de FCG de los pacientes con periodontitis. Quizás el aumento en el tamaño muestral cambie los resultados de expresión de este miARN. Este trabajo aporta resultados sólidos sobre posibles marcadores epigenéticos que se implican en la patogénesis periodontal. Sin embargo, es posible que al aumentar el tamaño muestral los resultados varíen, de modo que algunos de los miARNs que en el estudio de secuenciación masiva no alcanzaban la significatividad, podrían hacerlo en el estudio de RT-qPCR.

### **7.2.3. Discusión de los resultados respecto al tercer objetivo: Seleccionar una firma de miARNs capaces de definir la periodontitis**

#### **7.2.3.1. Interpretación de los resultados sobre las vías metabólicas implicadas en periodontitis. Estudio funcional de las rutas moleculares KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) reguladas por los miARNs**

En este apartado de la discusión se detallan brevemente las rutas moleculares KEGG en las que los miARNs con expresión diferencial están representados en pacientes con periodontitis. Se descartaron las rutas que tenían relación con procesos oncológicos y aquellas rutas que no guardaban relación con la fisiopatología de la periodontitis al no presentar estudios que apoyasen su implicación en la enfermedad.

Las diecinueve rutas que finalmente fueron escogidas, en base al perfil de expresión diferencial de los miARNs, se encontraban implicadas en procesos relacionados con el metabolismo óseo, la respuesta inflamatoria, la rotura de uniones de células epiteliales y la invasión bacteriana de células epiteliales. En cada punto se describe su posible relación con la patogénesis periodontal y se anotan algunas de las referencias bibliográficas encontradas que dan soporte a su relación con la periodontitis.

#### **Interacción de receptores epiteliales con componentes de la MEC (matriz extracelular)**

Las células epiteliales gingivales expresan numerosas moléculas de adhesión, como las integrinas que median en la interacción entre componentes de la MEC de la lamina

basal interna y la membrana basal externa del epitelio de unión (De-Gennaro y cols., 2006; Larjava y cols., 2014). En condiciones de inflamación, se produce una pérdida de contacto entre integrinas y células de la capa basal del epitelio, lo que ocasiona una pérdida de función por parte de las células en su adhesión a componentes de la MEC (Gräber y cols., 1999).

EL TNF- $\alpha$ , es una citocina proinflamatoria que inhibe la síntesis de componentes de la MEC y presenta efectos antagonistas a TGF $\beta$ -1 (agente profibrótico que estimula la producción de colágeno, fibronectina y activa la fosforilación de proteína SMAD). La interacción entre citocinas podría explicar la reparación tisular retrasada en procesos de inflamación crónica de los tejidos gingivales característica de la periodontitis (Arancibia y cols., 2013; Yoshimoto y cols., 2016; Hongo y cols., 2016).

Amano en 2003, estudió la capacidad de las fimbrias de *PG* para interrumpir la unión entre integrinas y receptores de la MEC con proteínas (Amano, 2003). Ruggiero y cols., 2013, encontró que las gingipainas secretadas por la *PG* aumentaban la Tenascina-C (anti-adhesiva) y disminuían la fibronectina (adhesiva) afectando ambas a la interacción entre fibroblastos y los receptores de la MEC (Ruggiero y cols., 2013).

Los datos del estudio de Cho y cols., 2017, indicaban que el tabaco alteraba el patrón de metilación de los genes relacionados con la organización de los componentes de la MEC. Los autores sugerían que esto producía un efecto inhibitorio en la capacidad de regeneración de los tejidos periodontales y favorecía el proceso crónico destructivo (Cho y cols., 2017).

### **Vía de señalización Hippo**

El proceso de homeostasis ósea está regulado por la vía de señalización de Hippo (Wen y cols., 2017). Esta vía participa en la regulación pre-osteoclástica, la diferenciación, la apoptosis, la supervivencia de los osteoclastos y también pueden modular la diferenciación y la función de los osteoclastos mediante la interacción con cascadas de señalización mediadas por RANKL, donde se incluyen moléculas como NF- $\kappa\beta$ , MAPKs (proteína quinasa activada por mitógeno), AP1 (proteína activadora 1) y NFATc1 (factor nuclear de células T activadas) (Yang y cols., 2018).

Wen y cols., 2017, observaron que al bloquear la proteína YAP (una molécula de la vía hippo), se inhibía la actividad proliferativa y se inducía a la apoptosis de las células del ligamento periodontal (Wen y cols., 2018; Xiang y cols., 2018; Nagayama y cols., 2012).



### **Uniones adherentes (e-cadherin)**

Algunos autores destacan la capacidad de algunas bacterias periodontopatógenas (complejo rojo de Socransky) para romper la integridad de las uniones adherentes del epitelio gingival favoreciendo la invasión bacteriana y la infección crónica (Hatakeyama y cols., 2006; Belibasakis y cols., 2015; Katz y cols., 1999). La PG presenta capacidad proteolítica a través de las gingipaínas, que son capaces de romper estas uniones adherentes, comprometiendo la integridad del epitelio (Hintermann y cols., 2002; Katz y cols., 2002; Nagarakanti y cols., 2007).

La E-Cadherina es una glicoproteína transmembrana responsable de la adhesión epitelial intercelular. Aparece frecuentemente en salud gingival, pero su expresión proteica disminuye cuando existe patología (Loo y cols., 2010). En el estudio de Loo y cols., 2010, se estudió en muestras sanguíneas la expresión de COX2 (importante en la síntesis de PGE2 a partir de ácido araquidónico) y la expresión de la E-Cadherin en tres grupos (periodontitis, cáncer de pecho y sanos). Observaron hipermetilación en islas CpG de genes que codificaban para la E-Cadherina y COX2 de forma más significativa en pacientes periodontales que en sanos ( $p < 0.0001$ ), lo que llevaría a una menor expresión de estos genes. Los hallazgos mostraron que la inflamación crónica y el cáncer podrían mostrar cambios similares en los patrones genómico y epigenético.

### **Biosíntesis de ácidos grasos**

Los prostanoides (prostaglandinas y tromboxanos) son moléculas lipídicas bioactivas que derivan del ácido graso araquidónico (Noguchi y Ishikawa, 2007). En respuesta a múltiples estímulos, el ácido araquidónico se libera desde la membrana fosfolipídica y es metabolizado hacia prostaglandina y tromboxano gracias a la ciclooxigenasa 1 y 2. Algunos autores como Yen y cols., 2008, describieron que el uso de un inhibidor selectivo de la COX2 (*Celecoxib*) como coadyuvante al tratamiento de soporte periodontal aportaba mejoría en los parámetros clínicos y reducía la pérdida de inserción en pacientes con periodontitis.

La PGE2, es el producto principal de la vía del metabolismo del ácido araquidónico. La PGE2 induce la proliferación de las Células T, disminuye la expresión de IL-12, TNF $\alpha$ , IL-8, ICAM1, IL-1 $\beta$ ; y aumenta la síntesis de MMPs y IL-6, que a su vez induce la diferenciación de linfocito B hacia la formación del osteoclasto (Noguchi y Ishikawa, 2007). Se considera un potente estimulador de la resorción ósea. Activa NF- $\kappa$ B en los osteoblastos y células mesenquimales para formar osteoclastos. La COX2 produce PGE2

que con la estimulación de IL-1 y LPS, estimula la osteoclastogénesis a través del aumento de expresión de RANKL y disminución de producción de OPG (Noguchi y Ishikawa, 2007).

Los niveles de PGE2 y COX 2 en el FCG estaban significativamente aumentados en pacientes con periodontitis y su concentración en este fluido permitía predecir el riesgo futuro de progresión (Offenbacher y cols., 1986; Zhang y cols., 2003; Noguchi y Ishikawa, 2007).

Bäck y cols., 2007, observaron niveles altos de leucotrienos en el FCG de pacientes con periodontitis y se apunta una posible relación entre aterosclerosis y periodontitis compartiendo esta molécula inflamatoria.

La restauración de la homeostasis tisular tras el daño inicial se produce en parte por la generación de lípidos endógenos como las resolvinas, protectinas y lipoxinas. Las lipoxinas derivan del ácido araquidónico mientras que las resolvinas y protectinas lo hacen de ácidos grasos libres omega 3 (Freire y Van Dyke, 2013). Estas moléculas renuevan la homeostasis tisular. Se apunta que un fallo en esta respuesta resolutive condiciona un estado de inflamación crónica, característica de las patologías inflamatorias crónicas como la periodontitis (Freire y Van Dyke, 2013). Los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (Lc-PUFA), derivan de ácido araquidónico y pueden estar involucrados en acciones pro y anti-inflamatorias. La concentración en suero de Omega 3 y 6 (Lc-PUFAs) fueron mayores en pacientes con periodontitis crónica (Martinez y cols., 2013).

### **Vía de señalización p53**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) activan vías proinflamatorias. La inhibición de la liberación de ROS se logra mediante la MAPK (*proteína kinasa activada por mitógeno* e inducida por LPS) y el NF- $\kappa$ B, ambos relacionados con la patogénesis periodontal (Park y cols., 2015).

El p53 está involucrado en la fosforilación oxidativa (OXPHOS) que se encarga de promover la producción de ROS. El p53 es un supresor tumoral que promueve la muerte celular e inhibe la proliferación de las células (Sabharwal y Schumacker, 2014; Kim y cols., 2013). En el estudio de Liu y cols., 2018, los LPS indujeron inflamación en los fibroblastos gingivales via p53 y producción de ROS (Liu y cols., 2018).

Por otro lado, las gingipainas de la PG causan apoptosis de células epiteliales gingivales y osteoblastos (Stathopoulou y cols., 2009; Zang y cols., 2018; Wang y cols., 2015). Zang y cols. en 2018 demostraron que las gingipainas inducían la inhibición de la

fosforilación de ERK/PKB resultando en la muerte celular de osteoblastos a través de la vía de señalización p53 (Zang y cols., 2018).

### **Proteólisis mediada por Ubiquitina**

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona de las células eucariotas involucrada en procesos como la respuesta inmune del hospedador, el desarrollo y la muerte celular programada (Jiang y Chen, 2012).

Estudios recientes sugieren que las proteínas poli-ubiquitinadas se acumulan en la superficie bacteriana y ello juega un papel importante en el reconocimiento de patógenos bacterianos, actuando como agentes antimicrobianos y participando en la autofagia (Jiang y Chen, 2012; Perrin y cols., 2004; Kieffer y cols., 2003; Ponpuak y cols., 2010; J)

Varios trabajos observaron que el proceso de ubiquitinación estaba implicado en procesos o vías inflamatorias relacionadas con la patogénesis periodontal, como la co-activación de TLR2, inhibición de TNF- $\alpha$ , inhibición de NF- $\kappa$ B y capacidad autofágica (Maekawa y cols., 2014, Cai y cols., 2016, Wartz y cols., 2004). La activación de NF- $\kappa$ B también necesita de un proceso de ubiquitinación (Ghosh y cols., 2010; Tsuchida, 2017).

En periodontitis crónica, el estudio de Liu y cols en 2011, sugería que la regulación negativa producida por el aumento de miR-17 suprimía la diferenciación osteogénica a través de la degradación mediada por la proteína Smurf-1 (*Smad ubiquitin regulatory factor one*) de Runx2 (un factor de transcripción clave para la osteogénesis) mediante proceso de ubiquitinación (Liu y cols., 2011).

### **Vía de señalización FoxO**

La expresión genética de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , COX2, lipooxigenasa, NF- $\kappa$ B, PGE2, ICAM y E-selectina (estas dos últimas dependientes de NF- $\kappa$ B), todas implicadas en la patogénesis de la periodontitis, depende de un correcto balance redox (Yu, 1996; Chung y cols., 2011).

Las FoxO son factores de transcripción que inducen una reducción de genes diana relacionados con el estrés oxidativo, metabolismo y ciclo celular. FoxO se une a  $\beta$ -catenina y regula la apoptosis, la reparación de ADN y la degradación de ROS. Un aumento en ROS, activa FoxO y se inhibe la formación ósea y promueve la resorción ósea a través de la vía Wnt (Galli y cols., 2011).

Los FoxO actúan a través de la vía Akt/PI3k. Regulan el metabolismo celular, IGF (Insulin growth factor), insulina y glucagon. Inducen la activación de Akt, que al fosforilar FoxO lo retiene fuera del núcleo (donde es inactivo). Esto favorece que las células- $\beta$  del páncreas proliferen para crear más insulina, pero hace que las defensas contra los ROS disminuyan. Además, la hiperglucemia y la resistencia a insulina favorecen una situación inflamatoria que aumenta las citocinas generando más ROS. Esto necesita más FoxO para contrarrestar las ROS a expensas de disminuir la respuesta a insulina. Esto podría ayudar a explicar la interacción dual periodontitis-diabetes (Galli y cols., 2011).

La hipoxia y generación de ROS, son comunes en patologías inflamatorias como la periodontitis. Los FoxO actúan en el núcleo en ausencia de factores de crecimiento o en presencia de estímulos estresantes transcribiendo muchos genes diana. Los FoxO inducen la expresión de genes que controlan las defensas contra el estrés oxidativo y la supervivencia celular (Galli y cols., 2011). Se ha visto que las ROS presentan un papel importante en el metabolismo celular de los osteoclastos aumentando la expresión de RANKL y TNF $\alpha$  a través de ERK y NF- $\kappa$ B. La periodontitis crearía un estado de estrés oxidativo que activaría una cascada de productos de oxidación que estimularían la resorción ósea e inhibirían la formación de hueso (Galli y cols., 2011).

### **Adhesión focal**

La IL1 $\beta$  promueve la degradación de componentes de la MEC a través de MMP mientras que los fibroblastos generan componentes de la MEC. La vía ERK se modula por interacciones celulares a través de adhesiones focales con el sustrato que a su vez regulan señales de transducción inducidas por factores de crecimiento y citocinas. Los receptores de IL1 presentes en los fibroblastos se localizan en adhesiones focales, y la estimulación de estas células con IL-1 $\beta$  durante la inflamación y la curación, ocasiona un remodelamiento dinámico de filamentos de actina y adhesiones focales (Herrera y cols., 2006). Esta vía está conectada con la vía de uniones adherentes.

### **Vía de señalización Wnt**

La familia de proteínas ligandos wingless/integrase (Wnt) y sus antagonistas funcionales las proteínas secretadas *frizzled-related* (sFRPs) son la vía canónica en la diferenciación de los osteoblastos, en la que la activación de  $\beta$ -catenina promueve la proliferación y diferenciación osteoblástica y evita la osteoclastogénesis, así como la apoptosis osteoblástica y osteocitaria. (Maekawa y cols., 2017).

La fosforilación de la  $\beta$ -catenina impide su migración al núcleo y conduce a la reducción de la formación ósea y el aumento de la resorción ósea. La vía WNT es inhibida por la acción de Dickkopf (DKK), una familia de proteínas secretadas que ejercen un efecto antagonista (Liu y cols., 2018; Liang y cols., 2016; Rivadeneira y Mäkitie, 2016).

La vía RANK/RANKL/OPG y la vía Wnt/b-catenina son fundamentales en la regulación de la actividad celular ósea (Duan y Bonewald, 2016). De forma indirecta, la  $\beta$ -catenina aumenta el ratio OPG/RANKL reduciendo la resorción ósea (Glass y cols., 2005). La SOST (esclerostina) y el DKK (Dickkopf) son inhibidores de la vía Wnt/b-catenina por lo que favorecen la resorción ósea. Se han observado cantidades elevadas de SOST y DKK en periodontitis (Napimoga y cols., 2014; Miranda y cols., 2017; Sousa y cols., 2016).

Wang y cols., 2016, observaron que los miR-29b, miR-204/211, miR-182 participaban en la osteogénesis a partir de células mesenquimales del ligamento periodontal. Los genes diana expresaban FoxO, que inhibía la vía Wnt. El mismo grupo de investigadores en 2017, observó que el miR-155-3p, aumentaba la  $\beta$ -catenina, demostrando que el miR-155-3p a través de TNF- $\alpha$  inhibía la osteogenesis y la cementogenesis a través de la inactivación de la vía Wnt (Wang y cols., 2017).

### **Vía de señalización PI3k/Akt.**

La vía PI3K está relacionada con la diferenciación y supervivencia de los osteoclastos, es decir con la osteoclastogénesis (Wu y cols., 2016).

La producción de quimioquinas se ve regulada negativamente por la vía PI3k/Akt, encargándose de mantener la respuesta innata en equilibrio (Rohani y cols., 2010). En tejidos con periodontitis se observó que la fosforilación de PI3k/Akt disminuía la expresión de HO1 (Park y cols., 2011; Assinger y cols., 2011). La HO-1 (hemo-oxigenasa 1) es una enzima que participa en la homeostasis tisular reduciendo el estrés oxidativo, aumentando los niveles de citocinas anti-inflamatorias IL-10 y IL-13 y reduciendo los niveles de citocinas pro-inflamatorias activadas por LPS como la TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (Park y cols., 2011; Assinger y cols., 2011; Xi y cols., 2015).

En la periodontitis, se ha demostrado que la bacteria *PG*, inactiva la vía de señalización de PI3K/Akt en las células gingivales a través de los efectos proteolíticos de las gingipaínas, dando como resultado la desregulación de las funciones celulares dependientes de PI3K/Akt y la alteración del epitelio gingival y desarrollo de enfermedades periodontales (Nakayama y cols., 2015; Nakayama y cols., 2017).

### **Invasión bacteriana de células epiteliales**

Algunas bacterias periodontopatógenas son capaces de invadir las células epiteliales gingivales (Vieira Colombo y cols., 2006; Kochi y cols., 2017). El AA, PG, TF y TD, son capaces de aumentar la permeabilidad celular epitelial, adherirse y penetrar en las células epiteliales (Fives-Taylor y cols., 1995; Shin y Choi, 2012).

La PG que invade las células epiteliales a partir de las gingipaínas, produce la degradación o la disminución de los niveles de mTOR, lo que se relaciona con la autofagia de células como los fibroblastos (Stafford y cols., 2013), favoreciendo la perpetuación o cronificación característica de la periodontitis.

Tras la adhesión e invasión de esta PG a las células epiteliales, se genera una respuesta pro-inflamatoria con liberación de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  (Amano, 2003; Deshpande y cols., 1998; Sandros y cols., 2000; Sandros y cols., 1994)

El AA, presenta leucotoxinas y otras proteínas que disminuyen la expresión de E-cadherina favoreciendo el daño de la barrera epitelial y la invasión bacteriana. El AA induce la síntesis de IL-8 y reduce la expresión de integrinas reduciendo la adhesión epitelial permitiendo la invasión tisular bacteriana (Mishima y Sharma, 2011; Kochi y cols., 2017).

Las uniones estrechas a nivel epitelial (TJ), se encargan de formar la barrera epitelial, pero estas bacterias periodontopatógenas pueden modular estas moléculas de unión. Los factores de crecimiento EGF (*epidermal growth factor*), y KGF (*keratinocyte growth factor*), IGF1, FBGF (*Fibroblast Growth Factor*) se involucran en la regulación de la homeostasis de estas TJ y por tanto en la permeabilidad celular (Choi y cols., 2014). En periodontitis Choi y cols. en 2014, observaron una expresión alterada de los factores de crecimiento y de las TJ, lo que favorecía una mayor permeabilidad tisular y favorecía la invasión celular por parte de los periodontopatógenos (Choi y cols., 2014).

### **Vía de señalización mTOR (*mammalian target of rapamycine*)**

El RANKL y M-CSF (factor estimulante de colonia de macrófagos) son moléculas esenciales en la diferenciación osteoclástica que media en la destrucción ósea en periodontitis y artritis reumatoide (Li y cols, 2017). La vía mTOR se activa por receptores de células T (TCR), receptores de células B (BCR), varios receptores de citocinas y por TLR. mTOR promueve la supervivencia del osteoclasto al ser activado por M-CSF, RANKL y TNF- $\alpha$ . Así, con la inhibición de PI3K/Akt/mTOR, se produce la apoptosis del osteoclasto y evita o reduce la resorción ósea (Kim y cols., 2012).

La Rapamicina es un inhibidor de mTOR, y puede regular negativamente la expresión de RANKL, M-CSF y TNF- $\alpha$ , además de suprimir la proliferación y diferenciación de osteoclastos (Bezamat y cols., 2018). Bezamat y cols., 2018, utilizaron la rapamicina para bloquear mTOR y la resorción ósea en pacientes con periodontitis y vieron que además promovía la formación de hueso y reducción de la respuesta inflamatoria (Benzamat y cols., 2018)

La ruta de señalización de mTOR parece estar relacionada con la enfermedad periodontal a través de un mecanismo mediado por las gingipaínas y microvesículas lipofílicas de PG (Waller y cols., 2016; Qi y Zhang, 2014). De hecho, Stafford y cols. 2013, describieron cómo PG, producía un aumento de niveles de mTOR en las células epiteliales orales del hospedador después de su invasión (Waller y cols., 2016; Stafford y cols, 2013).

### **Vía de señalización HIF-1 (hipoxia inducible factor-1)**

El HIF-1 (factor inducido por hipoxia), es un factor transcripcional que regula la expresión genética para mantener la homeostasis del oxígeno (Song y cols., 2012). En periodontitis, el aporte de oxígeno y su consumo están desequilibrados como consecuencia de la infiltración leucocitaria y la alteración de la microcirculación. Además, el biofilm bacteriano anaeróbico, disminuye la tensión de oxígeno en los tejidos (Takedachi y cols., 2017). Algunos mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ , son considerados estímulos no-hipoxémicos que también activan HIF-1 (Ng y cols., 2011).

En fibroblastos y células inflamatorias de tejidos periodontales, se ha visto un aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$ , lo que destaca el papel de la vía HIF-1 en la respuesta inflamatoria (Li y cols., 2012; Ng y cols., 2011). Ng y cols., en su estudio de 2011, observaron que el aumento en la expresión de HIF-1 aumentaba la transcripción de VEGF, lo que se correlacionaba con la tendencia al sangrado en bolsas periodontales activas (Ng y cols., 2011).

La inflamación de los tejidos periodontales tras el reconocimiento de LPS bacterianos, ocasiona una hipoxia tisular, con aumento de HIF-1 que favore la formación de ROS y liberación de moléculas pro-inflamatorias (PGE2, MMP2, MMP9) (Gölz y cols., 2015; Kim y cols., 2012).

Se ha estudiado que existe una correlación positiva entre eventos negativos de la vida, estrés psicológico, ansiedad y la susceptibilidad a las enfermedades periodontales (Huang y cols., 2011). Huang y cols., 2011, en su estudio observaron que el estrés disminuía la oxigenación y producía hipoxia en los tejidos periodontales. Encontraron

niveles de HIF-1 $\alpha$  significativamente mayores junto a una mayor pérdida de inserción en el grupo de periodontitis más estrés, al compararlo con el grupo solo con periodontitis.

A nivel del metabolismo óseo, se ha visto que la hipoxia puede ocasionar una desregulación entre MMP y TIMP favoreciendo la destrucción de los tejidos periodontales (Yu y cols., 2015). Yu y cols. (2015) realizaron un experimento en el que encontraron que la hipoxia aumentaba el ratio RANKL/OPG acelerando la pérdida ósea (Yu y cols., 2015).

### **Vía de señalización del Estrógeno**

Se han encontrado receptores para estrógenos y progesterona en los tejidos periodontales, y se ha visto que estos tienen un efecto en la microcirculación, aumentando la permeabilidad y favoreciendo procesos fisiológicos que condicionan una mayor susceptibilidad a enfermedades gingivales (Carrillo-de-Albornoz y cols., 2010; Preshaw, 2012; Nilsson, 2007; Nuñez y cols., 2010; Asnani y cols., 2014).

Durante el ciclo menstrual, se produce una fluctuación en las hormonas estrógenos y progesterona, afectando a los niveles de inflamación gingival del periodonto. El aumento en la IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , el VEGF, PGE2, y el aumento en *Prevotella Intermedia* se han relacionado con aumentos en los niveles de estrógeno (Machtei y cols., 2004; Baser y cols., 2009; Figuero y cols., 2006).

Al comparar un grupo con déficit de estrógeno y otro con niveles normales, los pacientes con déficit en estrógeno presentaban mayores niveles de sangrado al sondaje o inflamación y mayor pérdida ósea. (Reinhardt y cols., 1999). Además, la incidencia de periodontitis aumenta en mujeres menopáusicas con déficit de estrógeno y de densidad ósea (Payne y cols., 1997; Blasco-Baque y cols., 2012; Xu y cols., 2015; Suri y Suri, 2014).

### **Infección por HTLV-1 (virus linfotrópico humano 1)**

Recientemente, se ha implicado a los virus en la patogénesis periodontal (Garlet y cols., 2010). Se ha asociado la transcripción de genes para la síntesis de citocinas a la infección con virus linfotrópico humano 1 (HTLV1). La infección con este virus aumenta las células TCD4, TCD8 (que a su vez aumenta IFN- $\gamma$ ) y quimiocinas, y produce una disminución de IL-10 y TGF- $\beta$ , reduciendo la respuesta inmune (Garlet y cols., 2010). Garlet y cols., en su estudio de 2010, observaron que la infección con HTLV-1 podría tener un papel importante en la patogénesis de la periodontitis por su desregulación sobre la red de citocinas, lo que produciría una respuesta exagerada contra la infección de las bacterias periodontopatógenas (Garlet y cols., 2010).



### **Apoptosis**

En el proceso inflamatorio, los neutrófilos llegan a la zona infectada y tienen que activarse y eliminar los agentes para después morir y desaparecer. Si estos persisten, crean unas condiciones que favorecen la invasión bacteriana y actúan como señales que activan macrófagos y se segregan gránulos neutrofílicos que perpetúan la inflamación. La activación de TLR, retrasa la apoptosis de los neutrófilos, y algunas bacterias periodontopatógenas como *PG*, dificultan a través de enzimas y de la unión de fimbrias a TLR2/CD14 el reconocimiento de los neutrofilos por los macrófagos (Nussbaum y cols., 2011).

La falta de eliminación y retraso en la apoptosis de los neutrofilos en los tejidos periodontales, transforma a estos defensores en “perpetuadores” de la inflamación (Nussbaum y cols., 2011).

### **Vía de señalización ErbB (o EGF: factor de crecimiento epidermoide)**

Cuando alguna de las moléculas de la familia del EGF se une a los receptores ErbB, se inician múltiples vías de señalización que afectan a la proliferación, la supervivencia y la diferenciación celular, todas mediadas por la proteína MAPK (Genetos y cols., 2010; Ekuni y cols., 2010). Algunos estudios sugieren que la activación prolongada de la ruta de las MAPK produce sobre-expresión de la metaloproteinasa MMP-9 (McCawley y cols., 1999), la cual se encontraba en niveles muy elevados en periodontitis y se considera un biomarcador de la enfermedad periodontal (Mäkälä y cols., 1994).

### **Vía de señalización de la Prolactina**

En las células del ligamento periodontal, cuando los niveles de prolactina (involucrada en vías como la PI3k/Akt) eran elevados, se observó que se suprimía la proliferación de células del ligamento periodontal y se inducía a la diferenciación de células osteoblásticas, por lo que la prolactina podría tener un papel regulador en el metabolismo óseo (Surarit y cols., 2016).

### **Vía de señalización del Esfingolípido**

Los lípidos provenientes de *PG* como las ceramidas (la clase más simple de esfingolípidos), podían aumentar la estimulación de FB y penetrar en los tejidos gingivales

potenciando la síntesis de PGE2 mediante aumento de IL-1 $\beta$  (Yu y cols., 2016; Nichols y cols., 2001).

Los PDHC (dihidroceramidas fosforiladas) se consideran factores de virulencia de los periodontopatógenos. Potencian la secreción de prostaglandinas por parte de los fibroblastos, promueven la osteoclastogénesis por RANKL (inhiben osteoblastos por unión a TLR2), presentan relación con problemas vasculares (aterosclerosis), estimulan la apoptosis de células endoteliales, aportan resistencia bacteriana (*PG*) al estrés oxidativo y se encuentran implicados en la síntesis de IL-6 (Olsen y Nichols, 2018).

### **Síntesis de las 19 rutas KEGG seleccionadas**

Estas 19 rutas se podrían agrupar en 5 bloques para englobar las funciones biológicas en las que pueden participar. Estos bloques son: 1) Alteración de la integridad de uniones celulares, 2) Invasión bacteriana de células epiteliales, 3) estrés oxidativo, 4) apoptosis celular y 5) metabolismo óseo.

En el caso de la alteración de la integridad de las uniones celulares se podría destacar, que muchas de las rutas describen o se implican en procesos relacionados con la permeabilidad tisular o epitelial, la rotura de las uniones intercelulares del epitelio de unión o la invasión de células epiteliales por parte de los microorganismos bacterianos. Como se ha apuntado en la introducción, cuando se habla de periodontitis, es ineludible mencionar el efecto de las bacterias sobre las células epiteliales y cómo este proceso afecta a la activación de vías moleculares que se relacionan con síntesis de moléculas pro-inflamatorias y la alteración de la homeostasis tisular, como son:

1. Vía de interacción de receptores epiteliales con componentes de la MEC
3. Uniones adherentes (E-Cadherin)
8. Adhesión focal
10. Vía señalización de PI3K/Akt

La evidencia científica describe como los factores de virulencia de los periodontopatógenos, alteran y desestructuran la integridad del epitelio gingival, rompen las uniones intercelulares (E-Cadherina), las uniones de las células epiteliales con componentes de la matriz extracelular y todo ello ocasiona un aumento en la permeabilidad tisular que permite una mayor facilidad para la invasión bacteriana (Bosshardt y Lang, 2005). Las gingipaínas producidas por las bacterias, son capaces de romper esta barrera epitelial al influir o alterar en la vía

de señalización PI3K/Akt (Nakayama y cols., 2017). En el contexto de la epigenética, encontramos el estudio de Loo y cols., 2010 en el que observaron en muestras sanguíneas de pacientes afectados de periodontitis la hipermetilación de las islas CpG en genes que codificaban para E-Cadherin. Este estado de hipermetilación, debería producir una menor expresión de E-Cadherina lo que podría suponer una menor unión intercelular epitelial o una mayor permeabilidad tisular en tejidos con periodontitis (Loo y cols., 2010).

Estos mismos periodontopatógenos, presentan la capacidad de invadir las células epiteliales. En el caso del bloque de rutas relacionadas con la Invasión bacteriana de células epiteliales se encuentran las rutas:

10. Vía de señalización PIK3/AKT
11. Invasión bacteriana de células epiteliales
13. Vía de señalización HIF
15. Infección HTLV-1
16. Apoptosis

Tras el reconocimiento de los LPS bacterianos por los TLRs, se produce una activación de NF- $\kappa$ B, la disminución de la vía de señalización mTOR (que se relaciona con la autofagia), y la liberación de IL-10, IL-6, IL8 y TNF $\alpha$  (Stafford y cols., 2013). La invasión bacteriana intracelular, la desregulación de la apoptosis, la autofagia y la liberación de estas moléculas pro-inflamatorias son unos de los mecanismos empleados por los microorganismos periodontopatógenos para perpetuar o cronificar el estímulo inflamatorio (Amano 2003; Li y cols., 2012; Bezamat y cols., 2018).

El estrés oxidativo agruparía al tercer bloque de vías KEGG donde encontraríamos las vías:

5. Vía de señalización p53
7. Vía de señalización FoxO
9. Vía de señalización Wnt

Estas rutas se relacionan con las especies reactivas de oxígeno (ROS) y su influencia en el desbalance redox, de las que dependen moléculas tan importantes en la periodontitis como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , COX2, PGE2, NF- $\kappa$ B, ICAM y E-selectina entre otras (Park y cols., 2015; Wang y cols., 2015). La vía de señalización FoxO está considerada como una línea de defensa frente a los ROS, y su activación tiene

## Discusión

influencia en otras muchas vías de señalización (Chung y cols., 2011). Wang y cols., 2016, observaron que la inhibición en la cementogénesis y osteogénesis se producía como consecuencia de la inhibición de la vía Wnt a través de FoxO, y este hecho se relacionaba con niveles sobre-expresados de miARNs (miR-29b, miR-miR-204, miR-211, miR-182, miR-155-3p) (Wang y cols., 2016).

Respecto a la apoptosis celular, habría que recalcar, que debido a la activación de los TLR y la liberación de ciertas enzimas por los periodontopatógenos, una vez los neutrófilos cumplen su función los macrófagos no son capaces de eliminar a los neutrófilos y estos se convierten en perpetuadores del estímulo inflamatorio (Nussbaum y cols., 2011; Ponpuak y cols., 2010; Jiang y Chen, 2012). Algunos de los factores más importantes en la activación de la expresión de los genes relacionados con la inflamación como el NF- $\kappa$ B, necesitan de la ubiquitinación para activarse. En tejidos periodontales inflamados, se ha visto que existe hipoxia tisular y que esta evita la ubiquitinación de HIF-1 que induce la apoptosis de células del ligamento periodontal (Song y cols., 2012). En el ámbito de la epigenética, Liu y cols., 2011, observaron que el miR-17 inhibía a Smurf-1 lo que a su vez inhibía mediante ubiquitinación la proteína Runx2 (factor de transcripción de la osteogénesis), suprimiendo la diferenciación osteogénica. Las vías de este cuarto bloque son:

- 6. Proteólisis mediada por Ubiquitina
- 13. Vía de señalización HIF-1
- 16. Apoptosis

Por último, el bloque relacionado con el metabolismo óseo englobaría a las rutas KEGG:

- 2. Vía de señalización hippo
- 4. Biosíntesis de ácidos grasos
- 7. Vía de señalización FoxO
- 9. Vía de señalización Wnt
- 12. Vía de señalización mTOR
- 13. Vía de señalización HIF-1
- 14. Vía de señalización de estrógenos
- 17. Vía de señalización ErbB
- 18. Vía de señalización de prolactina
- 19. Vía de señalización de esfingolípidos

A modo de resumen, se podría describir que la vía de señalización hippo se relaciona con el ciclo celular del osteoclasto. Todo el ciclo guarda relación con moléculas como el RANKL, NF- $\kappa$ B y MAPK. La activación de esta MAPK se produce tras la unión de EGF al receptor ErbB y se ha relacionado también con el aumento en la MMP9 en tejidos con periodontitis (Yang y cols., 2018).

Respecto a la síntesis de ácidos grasos, se ha visto que durante la inflamación aumenta la COX2, lo que se relaciona directamente con un aumento en los niveles de PGE2, de MMP y IL-6 moléculas relacionadas con la destrucción tisular (Offenbacher y cols., 1986; Noguchi, 2007). Además, PGE2 es capaz de activar el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, y relacionarse con niveles altos de RANKL y bajos de OPG, teniendo una clara influencia en el metabolismo óseo osteoclástico en periodontitis (Zhang y cols., 2003).

Algunos de los productos resultantes de esta biosíntesis de ácidos grasos como las resolvinas se ha visto que presentan un papel importantísimo en la resolución de la inflamación de los tejidos periodontales y su alteración podría suponer una mayor susceptibilidad a la enfermedad (Feire y Van Dyke, 2013).

Las ROS afectan a la expresión de ciertos mediadores en los osteoclastos, de modo que aumentan los niveles de RANKL y TNF $\alpha$  a través de ERK y NF- $\kappa$ B involucrando a la vía de señalización FoxO (Galli y cols., 2011). La activación de la vía de señalización Wnt activa la  $\beta$ -catenina y esto de forma indirecta ocasiona un aumento del ratio OPG/RANKL en periodontitis inhibiendo la resorción ósea. Existen dos moléculas la SOST y el DKK que inhiben esta vía Wnt y que se han podido encontrar aumentados en tejidos afectados de periodontitis (Rivadeneira y Mäkitie, 2016).

El MCSF, RANKL y TNF $\alpha$  son capaces de activar la vía de señalización de mTOR. Esta vía se relaciona con un aumento de la supervivencia de los osteoclastos (Bezamat y cols., 2018). Qi y Zhang en 2014, observaron en células del ligamento periodontal que el aumento del miR-132 se relacionaba con una activación de mTOR, lo que suponía un aumento en la supervivencia de los osteoclastos (Qi y Zhang, 2014).

La hipoxia en tejidos periodontales inflamados aumenta el ratio RANKL/OPG y produce una desregulación de los MMP/TIMP. Ambos sucesos se relacionan con la destrucción de los tejidos de soporte periodontal (Yu y cols., 2015).

En cuanto a las vías de señalización de los estrógenos y prolactina, algunos investigadores observaron relación de los niveles de estas hormonas con el metabolismo óseo en periodontitis (Surarit y cols., 2016; Reinhardt y cols., 1999).

Por último, en este quinto bloque encontramos la vía de señalización de esfingolípidos. Algunos trabajos de investigación sugieren que estos esfingolípidos podrían considerarse factores de virulencia de los periodontopatógenos de modo que estos pueden inducir un aumento de PGE2, RANKL y IL-6, lo que se relaciona con un aumento en la osteoclastogénesis (Olsen y Nichols, 2018).

### **7.2.3.2. Selección y discusión de los miARNs que mejor clasifican a los sujetos periodontales**

En base al análisis bioinformático, teniendo en cuenta el p-valor, el resultado de la regresión logística (LASSO) y además, considerando la función de los miARNs en la regulación de las rutas metabólicas anteriormente desglosadas, se seleccionaron los siguientes diez miARNs para definir a los pacientes con periodontitis crónica generalizada avanzada:

- hsa-miR 30a-5p
- hsa-miR199a-3p
- hsa-miR199b-3p
- hsa-miR 338-5p
- hsa-miR 374b-5p
- hsa-miR 375
- hsa-miR 3648
- hsa-miR 29b-3p
- hsa-miR 4492
- hsa-miR 149-5p

En las diecinueve vías o rutas KEGG seleccionadas por su implicación en la patogénesis periodontal participan estos diez miARNs. Únicamente en la vía de síntesis de ácidos grasos y en la vía de adhesión focal, el miR-338 no estaba implicado.

Al tener en cuenta la relación fisiopatológica de las vías KEGG y no solamente el valor estadístico del análisis bioinformático para seleccionar los miARNs candidatos a validación, se aporta un mayor significado a los resultados.

Se pudo constatar como los miARNs obtenidos por análisis bioinformático como los más destacados en las muestras de periodontitis se encontraban en las rutas seleccionadas, lo que demuestra un buen ajuste en este caso de los miARNs obtenidos de las muestras de FCG con las vías moleculares en las que estos participan y que guardan una estrecha relación con la patogénesis periodontal.

De estos diez miARNs se seleccionaron los tres miARNs que presentaban una mayor potencia de expresión según el estudio bioinformático:

- hsa-miR 30a-5p
- hsa-miR199a-3p
- hsa-miR 338-5p

Además, basándonos en los artículos publicados hasta el momento y los resultados obtenidos de la revisión sistemática realizada previamente a esta investigación (Almiñana y cols., 2019; Saito y cols., 2017; Radovic y cols., 2018), se decidió escoger el hsa-miR146a-5p para valorar su posible utilidad como biomarcador en periodontitis. El miR-146-5p no alcanzó diferencias significativas en la expresión en los enfermos de periodontitis respecto a sanos. Pero su valor de *fold change* positivo, parecía tener más expresión en pacientes respecto a controles. Es posible que al aumentar el tamaño muestral de pacientes con periodontitis este hecho cambiase (p valor= 0.0937443; FDR=0.3557476).

#### **7.2.4. Discusión de los resultados respecto al cuarto objetivo: Realizar una validación de los miARNs seleccionados**

Tal y cómo se especifica en el apartado de material y método se realizó la validación de los cuatro miARNs por RT-qPCR en tiempo real mediante tecnología “*stem loop*” de TaqMan. Esta tecnología aporta una mayor especificidad ya que permite la unión del miARN específico y evita uniones de otros ARNs.

Los resultados de la validación destacan al miR-199b-3p como el miARN obtenido de muestras de FCG de pacientes con periodontitis avanzada que es más potente como biomarcador de periodontitis, obteniendo unos valores de sensibilidad y especificidad de 80% y 72,2% respectivamente.

El miR-146a-5p obtuvo un p valor de 0,05, mientras que el miR-338-5p y miR-30a-5p no obtuvieron diferencias estadísticamente significativas y no pudieron validarse en estas muestras de periodontitis avanzada.

### 7.2.4.1. miR-146a-5p

El miR-146a-5p obtuvo un p-valor de 0,05, estando justo en el límite de la significatividad. Sería interesante ver si al aumentar la muestra, estos resultados cambiarían.

El miR-146a-5p regula negativamente la señalización TLR tras el estímulo bacteriano. El aumento de este miR se correlaciona con menores niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y otras citocinas (Xie y cols., 2011); Además también evita la activación de NF- $\kappa$ B, uno de los principales factores de transcripción involucrado en la cascada de la inflamación e implicado también en el metabolismo óseo. Se ha visto que miR-146a-5p, presenta un gran impacto en la vía interferón e interleucina, suponiendo un papel importante en la patogénesis periodontal. Este miARN se encontró aumentado en las biopsias de tejidos con patología periodontal (Kadkhodazadeh y cols., 2013).

Cuando aumenta miR-146a-5p, disminuyen el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, y con ello se alteraría el eje RANK/RANKL/OPG hacia la osteoclastogénesis (Xie y cols., 2011; Motedayyen y cols., 2015; Kadkhodazadeh y cols., 2013). Kadkhodazadeh y cols., en 2013, observaron que los niveles de miR-146a-5p y miR-499 estaban aumentados en tejidos con patología periodontal. Parece ser que niveles altos de miR-146a-5p podrían activar el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, llevando en última instancia a la liberación de moléculas proinflamatorias (Kadkhodazadeh y cols., 2013). De acuerdo con estos hallazgos, Motedayyen y cols., en 2015 encontraron 32,6 veces más elevado este miR-146a-5p en los tejidos con patología periodontal que en los sanos, asociándolo con correlación positiva con profundidad de sondaje y con un nivel clínico de inserción más alto. Además, este mismo estudio observó niveles de TNF $\alpha$  e IL-6 más bajos cuanto más alto era el nivel de miR-146a-5p. Este miARN también se ha asociado a niveles bajos de EGF y TGF- $\beta$ , que



Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada disminuyen el potencial de regeneración y podrían relacionarse con respuestas no satisfactorias al tratamiento (Motedayyen y cols., 2015).

En otros ámbitos externos a la periodoncia, algunos estudios observaron que miR-146a-5p presentaba un importante papel en la inmunidad innata regulando la producción de citocinas en respuesta a los LPS bacterianos. Se ha implicado a este miARN en enfermedades inflamatorias y cáncer (Nahid y cols., 2011). An y cols., en su estudio de 2018, observaron niveles altos de miR-146a, que a su vez, aumentaba los niveles de expresión de ErbB y disminuía la expresión de NF- $\kappa$ B, inhibiendo la inflamación y apoptosis celular mitigando el daño cardíaco (An y cols., 2018).

Bagavad y cols., 2019, en pacientes con periodontitis y síndrome coronario agudo, vieron que existía un aumento de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  y del miR-146a. Los autores apuntaron que el miR146a-5p podría considerarse un marcador de respuesta inflamatoria en periodontitis y marcador de riesgo potencial de síndrome coronario agudo. Quizás puede ser apresurado o algo presuntuoso hacer esta afirmación, pero sin duda, merece la pena prestar atención a los resultados de este trabajo e investigar el uso potencial de este marcador.

#### **7.2.4.2. miR-199b-3p**

Se realizó una búsqueda del miR-199b-3p en la base de datos Diana tools mirPath v.3, para analizar los genes diana de este miARN. Se observó que estaba implicado en la expresión de genes relacionados con la vía de señalización de esfingolípidos, la biosíntesis de ácidos grasos, activación de NF- $\kappa$ B, intervenía en el ciclo celular de osteoblastos, estaba asociado con genes relacionados con la adhesión intercelular y también participaba en la expresión de genes relacionados con el metabolismo óseo. Es decir, como era de esperar, tenía una gran implicación en las rutas que se han descrito anteriormente.

Si revisamos la literatura, se encontraron algunos estudios que analizaban el papel de este miR-199b-3p. En relación con la periodontitis, ningún estudio hasta la fecha destaca especialmente la expresión de este miARN en tejidos con periodontitis.

En un contexto fuera de la periodontitis, Koshizuka y cols., 2017, en su estudio analizan la familia de miR-199 en cánceres de células escamosas de cabeza y cuello, y vieron que la familia de miR-199 estaba reducida en tejidos cancerosos. Demostraron que algunos de estos miR-199 (entre ellos el miR-199b-3p) inhibían la migración de células cancerígenas.

El miR-199b-3p participa en la regulación vía de señalización de HIF-1, que como se ha mencionado se encarga de la regulación de la diferenciación celular en condiciones de hipoxia (Suomi y cols., 2008).

Zhang y cols., 2012, en su estudio vieron que el miR-199b estaba implicado en la diferenciación de células madre derivadas de tejido adiposo hacia estirpe ósea. La familia de miR-199 estaba relacionada con BMP-2. Algunos de sus genes diana son SMAD y TGF $\beta$ 1. Por todo ello, este miARN podría tener un papel importante en el metabolismo óseo y por tanto una posible repercusión en la aparición y progresión de la periodontitis.

Zhu y cols., 2018, estudiaron la expresión de miR-199b en rechazos agudos tras un trasplante de pulmón. Observaron que el aumento en miR-199b presentaba un efecto anti-inflamatorio, ya que atenuaba la respuesta inflamatoria a través de vías de señalización NF- $\kappa$ B en monocitos. La estimulación con LPS bacterianos, disminuía el miR-199b. En consonancia con este artículo, podríamos plantear la hipótesis, que el miR 199b-3p debería tener alguna relación en la respuesta inflamatoria tras el reconocimiento bacteriano, ya que la cascada de señalización NF- $\kappa$ B, es de gran relevancia en el proceso inflamatorio y metabolismo óseo.

Por último, se podría destacar el estudio de Dolz y cols., 2017, titulado “miARNs circulantes como biomarcadores novedosos de progresión de estenosis en estenosis cardiacas asintomáticas”. Observaron cómo el miR-199b-3p entre otros miARNs, presentaban mayor expresión en pacientes con progresión de estenosis cardiaca.

Obviamente, la investigación en epigenética en otros campos de la medicina, como la cardiología, oncología, etc... es muy amplia y no puede analizarse adecuadamente en esta tesis doctoral. Pero se ha querido destacar algunos trabajos relacionados con otros aspectos sistémicos distintos a la periodontitis pero que de alguna forma, podrían guardar relación. Quedan fuera otras posibles relaciones como la relación con patologías hormonales, endocrinas, auto-inmunes, etc... que seguro sería interesante discutir. Pero sobretodo, la intención de esta última breve reseña sería destacar que estos marcadores epigenéticos y más concretamente los miARNs son una realidad en la medicina actual, y que en este aspecto, es interesante continuar investigando y quizá en un futuro ir aportando más datos que puedan encontrar relaciones entre las distintas afectaciones.

Se sugiere que existe una similitud en cuanto al proceso inmuno-inflamatorio entre la periodontitis y diferentes enfermedades sistémicas crónicas. Creemos que tiene un gran interés estudiar e identificar los factores epigenéticos (miARNs) en el FCG que se relacionan con la respuesta inmuno-inflamatoria en el periodonto, con el objetivo de

extrapolar estos conocimientos a aquellos procesos inmuno-inflamatorios sistémicos. Es decir, el periodonto puede servir como un “laboratorio periodontal”, de fácil acceso para estudiar la respuesta inmuno-inflamatoria de un individuo. De este modo, el FCG y en concreto los biomarcadores epigenéticos (miARNs) podrían ser un método diagnóstico a tener en cuenta para quizá poder “etiquetar” a cada sujeto y predecir el riesgo de aparición no sólo de patología bucal sino también sistémica.

### **7.3. Novedades que aporta esta tesis doctoral, limitaciones y propuesta de nuevas hipótesis y líneas de investigación**

La comparación entre estudios que analizan la relación de los mecanismos epigenéticos con la periodontitis arroja conclusiones heterogéneas, en buena parte debido a la diversidad metodológica aplicada en los estudios. Se observa que algunos trabajos analizan las diferencias de estos mecanismos entre pacientes con periodontitis agresivas (Andia y cols., 2010; Baptista y cols., 2014; Schulz y cols., 2016) y con periodontitis crónicas. Aunque la mayoría de estudios analizan biopsias de tejidos con periodontitis, otros autores analizan otros medios como el enjuague bucal con desxtrosa al 3% que solo obtiene células epiteliales (Oliveira y cols., 2009; Baptista y cols., 2014; Andia y cols., 2010), y muestras sanguíneas (Loo y cols., 2010; Wang y cols., 2014; Kadkhodaza y cols., 2013). Todo ello hace que la comparación entre los estudios sea aproximada, y sólo podamos extraer ideas e hipótesis con conclusiones que no son totalmente sólidas.

A partir del análisis cualitativo que se realizó con la revisión sistemática, se podría pensar que la regulación de la transcripción de algunos genes evita que el proceso inflamatorio sea decisivo. Es decir, ante un determinado proceso infeccioso bacteriano, se produce una respuesta inflamatoria con activación de diferentes vías moleculares y mecanismos inmuno-inflamatorios. El cambio en el entorno celular podría motivar una alteración a nivel epigenético en las células que componen los tejidos gingivales que fuese encaminado a suprimir el daño producido por la infección. Dicho de otra manera, el estado inflamatorio cambia y se adapta al entorno y los mecanismos epigenéticos se encargan en gran medida de regular la expresión genética, de modo que una vez se cronifica la inflamación se silencia o atenúa la expresión de genes relacionados con las moléculas proinflamatorias, con el fin de estabilizar la situación y evitar la pérdida total de los tejidos periodontales de soporte (Almiñana y cols., 2019).

Esta hipótesis podría responder a algunas preguntas que hasta la fecha no se han sabido contestar. Una de ellas es porque si existe una susceptibilidad genética en la periodontitis, los estudios fallan a la hora de destacar una alteración genética, o algún polimorfismo, como la responsable de la susceptibilidad a la periodontitis y que podría predecir la aparición de la periodontitis. En este sentido, los marcadores genéticos no tendrían en cuenta la influencia que a nivel de expresión génica podría tener el estilo de vida del paciente. Así, algunos factores que se han relacionado con la periodontitis, como la obesidad, la diabetes, el tabaquismo, el estrés o la ansiedad, podrían desencadenar cambios a nivel epigenético decisivos para qué en un momento dado, la “susceptibilidad del individuo” se viese aumentada y se desarrollara un periodo de rápida progresión de periodontitis. De este modo, el cambio en algunas marcas epigenéticas podría desencadenar la expresión o el silenciamiento de genes que podrían haberse detectado hasta el momento como candidatos a ser genes relacionados con la periodontitis.

Al realizar una investigación, se han de tener en cuenta siempre las limitaciones del estudio a la hora de interpretar los resultados. La principal limitación con la que cuenta esta tesis doctoral es el tamaño muestral reducido. Con este tamaño muestral tras realizar una regresión considerando la co-variable sexo y con un nivel de significatividad  $p < 0,005$  y un FDR (false discovery rate o intervalo de confianza)  $< 0,05$  (99,95%) se encontraron más de 10 microARNs expresados diferencialmente en ambos grupos. Por lo que se podría decir que el tamaño muestral fue suficiente para hallar resultados significativos. Sin embargo, a la hora de validar en otras muestras los miARNs únicamente 2 de los escogidos se pudieron validar. Seguramente estos resultados podrían sufrir modificaciones si aumentásemos el tamaño muestral, de modo que se podrían obtener diferencias significativas.

El análisis *post-hoc* de la potencia de estudio reveló que con el tamaño muestral del estudio la potencia alcanzada fue del 66% para el miARN-146a-5p y del 76% para el miARN-199b-3p. Los resultados de este estudio nos permiten conocer el tamaño muestral adecuado para alcanzar una mayor potencia. En una nueva cohorte de sujetos se debería de conseguir la participación de 36 sujetos para alcanzar una potencia del 80% y 48 sujetos para una potencia del 90%.

Además, se decidió escoger pacientes con el grado más avanzado de periodontitis frente a sujetos sanos, para poder así ver mayores diferencias. Esta claro que la muestra no es representativa de toda la patología periodontal. Se pretendía dar el primer paso en

esta línea de investigación, y se pensó que escoger los dos extremos podría ser útil para estudiar bien las diferencias.

Se decidió optar por no buscar los miARNs que la literatura apuntaba como destacados en periodontitis ya que estos se encontraban en biopsias de tejidos gingivales y muestras sanguíneas. Los estudios que posteriormente se publicaron en fluido crevicular, escogieron unos miARNs en función de estudios previos para basar su selección y evaluar su expresión. Nosotros quisimos realizar un rastreo masivo de miARNs en FCG mediante tecnología NGS. Esto permitió generar un registro bien establecido de los marcadores epigenéticos miARNs que encontramos en FCG de pacientes sanos y con periodontitis avanzada. Esta metodología aporta una mayor especificidad, ya que incluso durante la validación, se escoge el miARN más estable en todas las muestras para la normalización, en este caso el miR-223-3p.

Creemos que esta metodología estricta y bien diseñada construye una base sobre la que seguir investigando en este campo. Aunque ciertamente, este hecho ha limitado el tamaño muestral por el alto requerimiento de recursos, creemos que era necesario sustentar esta línea de investigación con una buena cimentación.

En nuestro estudio, cuando se observan las gráficas de expresión diferencial de los miARNs, los sujetos con periodontitis se encuentran claramente agrupados. En los controles sanos existe una mayor dispersión y dos de los sujetos presentan una expresión similar aunque ligeramente distinta a los sujetos enfermos. Curiosamente, al analizar los datos pudimos observar que estos dos sujetos presentaban porcentajes de sangrado al sondaje ligeramente superiores a 25%. Estos datos sirven para argumentar que se decidió mantener a estos sujetos en el análisis del estudio ya que aportarían gran información. Sabemos que aunque el porcentaje de sangrado era mayor, el sitio de toma de muestra en ningún caso presentaba inflamación clínica con sangrado al sondaje o patología periodontal detectable clínicamente. Nos pareció interesante ver cómo estos marcadores se comportaban en estos dos sujetos. Algunos marcadores inflamatorios se ha visto que aumentaban con el tiempo en pacientes periodontales y que no eran sitio-dependientes sino dependientes del paciente (paciente-dependientes) (Champagne y cols., 2003). Quizá una de las aplicaciones de estos biomarcadores epigenéticos podría ser la detección de la inflamación subclínica en periodontitis para poder prevenir la aparición de pérdida de inserción, y por ello sería interesante ver si estos marcadores son capaces de detectar en

sitios sanos la presencia de estos miARNs asociados a vías de señalización relacionadas con procesos inflamatorios destructivos.

Otra limitación que ha de ser comentada es que en esta tesis doctoral únicamente se analizaron los miARNs en fluido crevicular gingival. No se estudiaron los otros dos mecanismos epigenéticos, la metilación de ADN y las modificaciones de las histonas. Además, quedan fuera de este análisis los ARNs no codificantes de cadena larga. Generalmente, no es posible controlar todos los factores en una red multifactorial compleja. Al igual que aquellos estudios que se centran en moléculas relacionadas con la respuesta inmuno-inflamatoria, seguramente todos estos mecanismos epigenéticos presenten una interacción entre ellos, y dejar fuera del análisis algunas de estas interacciones es posible que pudiese suponer un sesgo o pérdida de información muy valiosa.

En cuanto a los miARNs, no debe olvidarse que estos ARNs no codificantes compuestos por 17-25 nucleótidos (Ambros, 2004; Bartel, 2004) sólo necesitan para la supresión de la expresión génica la unión de unos 6 pares de bases a los genes diana. Por tanto, un solo miARN puede ser un potencial controlador de la expresión de cientos de genes diana simultáneamente, y un gen obviamente, puede verse influido por cientos de miARNs teniendo un notable impacto en la síntesis proteica (Thomson y cols., 2011; Baek y cols., 2008). Este hecho es evidente al analizar las vías KEGG, en las que se puede ver como los miARNs que el análisis bioinformático resaltó como los más significativos en la expresión diferencial de sujetos enfermos frente a sanos presentaban genes diana comunes en estas vías.

Aunque se han realizado algunos estudios en FCG (Saito y cols., 2017; Micó y cols., 2018; Radovic y cols., 2018), estos estudios buscaron la presencia de ciertos miARNs en FCG. Ningún estudio que se conozca ha realizado una secuenciación masiva de miARNs en FCG. Este estudio es el primero que tras secuenciar todo el ARN del FCG observa que el 1,7% de este ARN se corresponde con la expresión de miARNs.

Escoger el fluido crevicular gingival y poder detectar estos miARNs en el fluido creemos que aporta una mayor validez como biomarcadores, ya que permite disponer de un acceso sencillo, no invasivo y económico (en cuanto a la toma de muestra, no en cuanto al procesado) a estos marcadores. Pero hay que recalcar también que en el fluido crevicular el origen de las moléculas o en este caso de los miARNs puede ser diverso, de modo que pueden derivar de células epiteliales, microorganismos bacterianos, u otros orígenes.

Esta tesis doctoral ha tenido como objetivo establecer las bases para continuar la investigación en este campo desde nuestro punto de vista muy prometedor. Recordando todas las limitaciones mencionadas, sí que podemos afirmar que esta investigación se ha realizado siguiendo una metodología estricta tanto en la selección de sujetos como en la toma de muestras y en el análisis de laboratorio. Los resultados parecen destacar al miR-199b-3p y miR-146a-5p como miARNs implicados en el proceso de patogénesis periodontal, o al menos mediando en la homeostasis o situación de equilibrio metastable que puede existir en una localización afectada de periodontitis avanzada, con una profundidad de sondaje superior a 6mm.

Se espera que el haber desglosado todas las rutas moleculares KEGG y su implicación evaluada científicamente en la periodontitis, y la selección de estos miARNs en base a estas rutas y al análisis bioinformático, sirva para continuar investigando cómo estos miARNs pueden estar relacionados con la aparición y progresión o desarrollo de la periodontitis. Por tanto, parece obvio que se debe continuar investigando y analizando diferentes grupos de sujetos. Una vez secuenciados todos los miARNs encontrados en FCG, los siguientes estudios podrán realizarse con tamaños muestrales mayores y representativos.

Desde nuestro punto de vista, la verdadera utilidad de estos biomarcadores epigenéticos no reside en detectar qué miARNs están presentes cuando la patología es evidente. Ya tenemos medidas clínicas que nos permiten el diagnóstico, no son invasivos y son claros. Además, como se ha mencionado anteriormente, la multifactorialidad y la compleja red de interrelación entre todas las rutas, moléculas pro-inflamatorias y miARNs-genes, seguramente condicione que sea muy difícil llegar a una conclusión verdaderamente sólida. Consideramos que la detección de algunos de estos miARNs en un estadio subclínico de periodontitis podría ser lo verdaderamente interesante y útil. La detección en FCG de uno o varios marcadores epigenéticos, en este caso miARNs, podría marcar la susceptibilidad de un individuo a desarrollar en un futuro pérdida de inserción detectable clínicamente. Sabemos que también se encuentran células inflamatorias, células plasmáticas y linfocitos, así como macrófagos en zonas sanas clínicamente (Bartold y cols., 2000). Aunque no se sabe con certeza si estas células aparecen en un conectivo clínicamente sano o son reflejo de una inflamación subclínica, es habitual encontrar un cierto infiltrado inflamatorio en el tejido conectivo gingival sano (Bartold y cols., 2000).

Tonetti y cols., en 2018, sugieren que en el estadio I de la nueva clasificación, los biomarcadores entre los que destacan a los marcadores epigenéticos, podrían ser de utilidad en este estadio inicial. Estamos totalmente de acuerdo con estos autores, y creemos que el definir unas firmas de miARNs que codifiquen un sujeto como susceptible de presentar una respuesta inmuno-inflamatoria que pueda llevarle a una pérdida de inserción clínica puede prevenir la aparición de la enfermedad y formar parte de lo que podríamos atrevernos a denominar periodoncia de precisión.

Otro aspecto que se ha mencionado en esta investigación y que no puede dejarse de lado en estos últimos párrafos es el dinamismo que reflejan los marcadores epigenéticos. En este contexto, los miARNs (y otros mecanismos epigenéticos) pueden identificar momentos de rápida progresión de periodontitis o de influencia de otras enfermedades sistémicas o factores de riesgo ambientales o comportamentales externos. Sabemos que existen trabajos que encuentran marcadores epigenéticos comunes en periodontitis y en otras enfermedades sistémicas como la diabetes mellitus, patología cardíaca, artritis reumatoide y cáncer. Aunque es una hipótesis, cabe la pena mencionar que quizá el fluido crevicular podría ser un fluido diagnóstico útil para el diagnóstico y control de estas patologías sistémicas. Podría ser interesante analizar si estos marcadores epigenéticos son capaces de reflejar ese famoso “código de barras” o estado susceptible a ciertas patologías al analizar el epigenoma en miARNs del FCG. Esta última afirmación pretende ser una nota de reflexión sobre la posible utilidad de los marcadores epigenéticos en el FCG en la medicina de precisión del futuro.

Estamos ante una nueva vía de investigación que puede aportar nueva información a los mecanismos implicados en la patogénesis periodontal. A nivel diagnóstico su utilidad como marcador de periodontitis parece que es adecuado, pero falta por investigar su posible utilidad como marcador diagnóstico que supere las deficiencias de las medidas clínicas que tenemos. En este aspecto, lo verdaderamente importante sería ver su utilidad para definir en estadios subclínicos, la susceptibilidad a la enfermedad o la presencia de la misma sin haber dado sintomatología. Se necesitan estudios de cohortes bien diseñados para valorar su utilidad como método diagnóstico.

La influencia que estos mecanismos epigenéticos tienen en la expresión de diferentes genes además de la capacidad de estos mecanismos para evaluar la repercusión del estilo de vida de los sujetos, puede hacer que mejore nuestro conocimiento de la fisiopatología periodontal en los siguientes años. Existen cuestiones como el por qué existen sujetos con progresiones más “agresivas o rápidas” de periodontitis, la influencia



Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada del estado de ansiedad o estrés en la progresión de la pérdida ósea o inflamación, la interacción con otras patologías sistémicas como la diabetes, la obesidad, la patología cardíaca, enfermedades autoinmunes... que no se ha podido comprender completamente hasta la fecha con la literatura existente. Con esta nueva estrategia de investigación focalizada en la comprensión de los mecanismos y mediadores epigenéticos, quizá algunas de estas cuestiones puedan ser aclaradas o al menos permita esclarecer más los mecanismos moleculares y celulares subyacentes a la periodontitis.



# CONCLUSIONES



## 8. CONCLUSIONES

1. El Screening masivo de miARNs en el FCG permitió secuenciar un 1,7% de miARNs del total de ARN de las muestras de FCG.
2. Se encontraron diez miARNs que se sobre-expresaban en pacientes con periodontitis crónica avanzada y que definían una firma para la periodontitis: miR-199a-3p; miR-199b-3p; miR-338-5p; miR-374b-5p; miR-30a-5p; miR-375; miR-3648; miR-29b-3p; miR-4492 y miR-149-5p.
3. Teniendo en cuenta el análisis ORA, la implicación en rutas biológicas (KEGG) y los niveles de expresión, el análisis bioinformático destacó cuatro miARNs para definir la periodontitis en esta muestra de sujetos: miR-30a-5p; miR-146a-5p; miR-199b-3p; miR-338-5p.
4. La validación de los cuatro miARNs en otras muestras solo pudo destacar al miR-146a-5p y miR-199b-3p como buenos marcadores de periodontitis avanzada.



# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**





## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainamo, A., Ainamo, J. and Poikkeus, R. (1981)** 'Continuous widening of the band of attached gingiva from 23 to 65 years of age.', *Journal of periodontal research*, 16(6), pp. 595–9.
- Ainamo, J. and Löe, H. (1955)** 'Anatomical characteristics of gingiva. A clinical and microscopic study of the free and attached gingiva.', *Journal of periodontology*, 37(1), pp. 5–13.
- Albandar, J. M. and Rams, T. E. (2002)** 'Global epidemiology of periodontal diseases: an overview', *Periodontology 2000*. Munksgaard International Publishers, 29(1), pp. 7–10.
- Alfano, M. C. (1974)** 'The origin of gingival fluid.', *Journal of theoretical biology*, 47(1), pp. 127–36.
- Almiñana-Pastor, P. J., Boronat-Catalá, M, Micó-Martinez, P., Bellot-Arcís, C., Lopez-Roldan, A., Alpiste-Illueca, F. M. (2019)** 'Epigenetics and periodontics: A systematic review', *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 24(5):659-72.
- Alpiste-Illueca, F. (2004)** 'Dimensions of the dentogingival unit in maxillary anterior teeth: a new exploration technique (parallel profile radiograph).', *The International journal of periodontics & restorative dentistry*, 24(4), pp. 386–96.
- Amano, A. (2003)** Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol.* 74(1):90-6.
- Ambros, V. (2004)** 'The functions of animal microRNAs', *Nature*, 431(7006), pp. 350–355.
- Andia, D. C., de Oliveira, N. F. P., Casarin, R. C. V., Casati, M. Z., Line, S. R. P. and de Souza, A. P. (2010)** 'DNA Methylation Status of the IL8 Gene Promoter in Aggressive Periodontitis', *Journal of Periodontology*. American Academy of Periodontology, 81(9), pp. 1336–1341.
- Anders S, Huber W (2010)**. "Differential expression analysis for sequence count data." *Genome Biology*, 11, R106.
- An, R. Feng J, Xi C, Xu J, Sun L (2018)**. miR-146a Attenuates Sepsis-Induced Myocardial Dysfunction by Suppressing IRAK1 and TRAF6 via Targeting ErbB4 Expression. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, p.7163057.
- Armitage, G. C. (1999)** 'Development of a Classification System for periodontal diseases and conditions', *World*, 4(1), pp. 1–6.

## Referencias bibliográficas

**Arancibia R1, Oyarzún A, Silva D, Tobar N, Martínez J, Smith PC (2013).** Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits transforming growth factor- $\beta$ -stimulated myofibroblastic differentiation and extracellular matrix production in human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 84(5):683-93.

**Asa'ad F, Bollati V, Pagni G, Castilho LM, Rossi E, Pomingi F (2017).** Evaluation of DNA methylation of inflammatory genes following treatment of chronic periodontitis: A pilot case-control study. *Journal of Clinical Periodontology*, 44: 905-914.

**Asnani, K. P., Hingorani, D., Kheur, S., Deshmukh, V. L. and Romanos, G. E. (2014)** 'Expression of nuclear receptors of gingiva in polycystic ovarian syndrome: A preliminary case study', *Australian Dental Journal*, 59(2), pp. 252–257.

**Assinger, A., Laky, M., Schabbauer, G., Hirschl, A. M., Buchberger, E., Binder, B. R. and Volf, I. (2011)** 'Efficient phagocytosis of periodontopathogens by neutrophils requires plasma factors, platelets and TLR2', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(4), pp. 799–809.

**Assuma, R., Oates, T., Cochran, D., Amar, S. and Graves, D. T. (1998)** 'IL-1 and TNF Antagonists Inhibit the Inflammatory Response and Bone Loss in Experimental Periodontitis', *The Journal of Immunology*, 160(1).

**Attström, R. (1970)** 'Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronically inflamed gingivae.', *Journal of periodontal research*, 5(1), pp. 42–7.

**Bäck, M., Airila-Månsson, S., Jogestrand, T., Söder, B. and Söder, P. Ö. (2007)** 'Increased leukotriene concentrations in gingival crevicular fluid from subjects with periodontal disease and atherosclerosis', *Atherosclerosis*, 193(2), pp. 389–394.

**Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P. and Bartel, D. P. (2008)** 'The impact of microRNAs on protein output.', *Nature. NIH Public Access*, 455(7209), pp. 64–71.

**Bagavad, G.J George AV, Pavithra N, Chandrasekaran SC, Latchumanadhas K, Gnanamani A (2019).** Dysregulation of miR-146a by periodontal pathogens: A risk for acute coronary syndrome. *Journal of Periodontology*, 00:1-10

**Baptista, N. B., Portinho, D., Casarin, R. C. V, Vale, H. F., Casati, M. Z., De Souza, A. P. and Andia, D. C. (2014)** 'DNA methylation levels of SOCS1 and LINE-1 in oral epithelial cells from aggressive periodontitis patients', *Archives of Oral Biology*, 59(7), pp. 670–678.

**Bartel, D. P. (2004)** 'MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.', *Cell*, 116(2), pp. 281–97.

**Bartold, P. M., Walsh, L. J. and Narayanan, A. S. (2000)** 'Molecular and cell biology of the gingiva', *Periodontology 2000*. Munksgaard International Publishers, 24(1), pp. 28–55.

- Baser, U., Cekici, A., Tanrikulu-Kucuk, S., Kantarci, A., Ademoglu, E. and Yalcin, F. (2009)** 'Gingival Inflammation and Interleukin-1  $\beta$  and Tumor Necrosis Factor-Alpha Levels in Gingival Crevicular Fluid During the Menstrual Cycle', *Journal of Periodontology*, 80(12), pp. 1983–1990.
- Belibasakis, G. N., Kast, J. I., Thurnheer, T., Akdis, C. A. and Bostanci, N. (2015)** 'The expression of gingival epithelial junctions in response to subgingival biofilms', *Virulence*, 6(7), pp. 704–709.
- Bensalah, K., Montorsi, F. and Shariat, S. F. (2007)** 'Challenges of cancer biomarker profiling.', *European urology*, 52(6), pp. 1601–9.
- Berglundh, T., Armitage, G., Araujo, M. G., Avila-Ortiz, G., Blanco, J., Camargo, P. M., Chen, S., Cochran, D., Derks, J., Figuero, E., Hämmerle, C. H. F., Heitz-Mayfield, L. J. A., Huynh-Ba, G., Iacono, V., Koo, K.-T., Lambert, F., McCauley, L., Quirynen, M., Renvert, S., Salvi, G. E., Schwarz, F., Tarnow, D., Tomasi, C., Wang, H.-L. and Zitzmann, N. (2018)** 'Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions', *Journal of Periodontology*. Wiley-Blackwell, 89, pp. S313–S318.
- Bergström, J. (2004)** 'Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease', *Odontology*, 92(1), pp. 1–8.
- Berkovitz, B. K. (1990)** 'The structure of the periodontal ligament: an update.', *European journal of orthodontics*, 12(1), pp. 51–76.
- Bernick, S. (1956)** 'The innervation of the teeth and periodontium of the rat.', *The Anatomical record*, 125(2), pp. 185–205.
- Bernstein, B. E., Stamatoyannopoulos, J. A., Costello, J. F., Ren, B., Milosavljevic, A., Meissner, A., Kellis, M., Marra, M. A., Beaudet, A. L., Ecker, J. R., Farnham, P. J., Hirst, M., Lander, E. S., Mikkelsen, T. S. and Thomson, J. A. (2010)** 'The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium.', *Nature biotechnology*. NIH Public Access, 28(10), pp. 1045–8.
- Bezamat, M., Deeley, K., Khaliq, S., Letra, A., Scariot, R., Silva, R. M., Weber, M. L., Bussaneli, D. G., Trevilatto, P. C., Almarza, A. J., Ouyang, H. and Vieira, A. R. (2018)** 'Are mTOR and Endoplasmic Reticulum Stress Pathway Genes Associated with Oral and Bone Diseases?', *Caries Research*, pp. 235–241.
- Birkedal-Hansen, H. (1993)** 'Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction.', *Journal of periodontal research*, 28(6 Pt 2), pp. 500–10.
- Birkedal-Hansen, H. (1993)** 'Role of Matrix Metalloproteinases in Human Periodontal Diseases', *Journal of Periodontology*, 64(5s), pp. 474–484.
- Blair, H. C., Teitelbaum, S. L., Ghiselli, R. and Gluck, S. (1989)** 'Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump.', *Science (New York, N.Y.)*, 245(4920), pp. 855–7.

## Referencias bibliográficas

- Blanchard, S. B., Derderian, G. M., Averitt, T. R., John, V. and Newell, D. H. (2012)** 'Cervical Enamel Projections and Associated Pouch-Like Opening in Mandibular Furcations', *Journal of Periodontology*. American Academy of Periodontology, 83(2), pp. 198–203.
- Blasco-Baque, V., Serino, M., Vergnes, J. N., Riant, E., Loubieres, P., Arnal, J. F., Gourdy, P., Sixou, M., Burcelin, R. and Kemoun, P. (2012)** 'High-Fat Diet Induces Periodontitis in Mice through Lipopolysaccharides (LPS) Receptor Signaling: Protective Action of Estrogens', *PLoS ONE*. 8(5).
- Blaushild, N., Michaeli, Y. and Steigman, S. (1992)** 'Histomorphometric Study of the Periodontal Vasculature of the Rat Incisor', *Journal of Dental Research*. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 71(12), pp. 1908–1912.
- Blieden, T. M. (1999)** 'Tooth-Related Issues', *Annals of Periodontology*, 4(1), pp. 91–96.
- Blondal T, Nielsen SJ, Baker A, Andreasen D, Mouritzen P, Teilum MW, Dahlsveen IK. (2013)** 'Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids', *Methods* 59, S1–S6.
- Bosshardt, D. D. and Lang, N. P. (2005)** 'The Junctional Epithelium: from Health to Disease', *Journal of Dental Research*. SAGE Publications, 84(1), pp. 9–20.
- Breivik, T., Thrane, P. S., Murison, R. and Gjermo, P. (1996)** 'Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis', *European Journal of Oral Sciences*. Blackwell Publishing Ltd, 104(4), pp. 327–334.
- Cai, B., Panek, J. S. and Amar, S. (2016)** 'Convergent synthesis of novel muramyl dipeptide analogues: Inhibition of porphyromonas gingivalis-induced pro-inflammatory effects by high doses of muramyl dipeptide'. *J. Med. Chem.* 2016, 59, 6878–6890.
- Caffesse, R. G., Kornman, K. S. and Nasjleti, C. E. (1980)** 'The Effect of Intensive Antibacterial Therapy on the Sulcular Environment in Monkeys: Part II: Inflammation, Mitotic Activity and Keratinization of the Sulcular Epithelium', *Journal of Periodontology*, 51(3), pp. 155–161.
- Carasol, M., Llodra, J. C., Fernández-Meseguer, A., Bravo, M., García-Margallo, M. T., Calvo-Bonacho, E., Sanz, M. and Herrera, D. (2016)** 'Periodontal conditions among employed adults in Spain', *Journal of Clinical Periodontology*, 43(7), pp. 548–556.
- Carrillo-De-Albornoz, A., Figuero, E., Herrera, D. and Bascones-Martínez, A. (2010)** 'Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm', *Journal of Clinical Periodontology*, 37(3), pp. 230–240.
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M. and Tonetti, M. S. (2018)** 'A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key

changes from the 1999 classification', *Journal of Periodontology*. Wiley-Blackwell, 89, pp. S1–S8.

Champagne, C. M. E., Buchanan, W., Reddy, M. S., Preisser, J. S., Beck, J. D. and Offenbacher, S. (2003) 'Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases', *Periodontology 2000*, 31(1), pp. 167–180.

Chang, K. M. and Lin, L. M. (1997) 'Diagnosis of an advanced endodontic/periodontic lesion: report of a case.', *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 84(1), pp. 79–81.

Chapple, I. L. C., Bouchard, P., Cagetti, M. G., Campus, G., Carra, M.-C., Cocco, F., Nibali, L., Hujoel, P., Laine, M. L., Lingström, P., Manton, D. J., Montero, E., Pitts, N., Rang, H., Schlueter, N., Teughels, W., Twetman, S., Van Loveren, C., Van der Weijden, F., Vieira, A. R. and Schulte, A. G. (2017) 'Interaction of lifestyle, behaviour or systemic diseases with dental caries and periodontal diseases: consensus report of group 2 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases', *Journal of Clinical Periodontology*, 44(S18), pp. S39–S51.

Chapple, I. L., Cross, I. A., Glenwright, H. D. and Matthews, J. B. (1995) 'Calibration and reliability of the Periotron 6000 for individual gingival crevicular fluid samples.', *Journal of periodontal research*, 30(1), pp. 73–9.

Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M. L., Genco, R. J., Glogauer, M., Goldstein, M., Griffin, T. J., Holmstrup, P., Johnson, G. K., Kapila, Y., Lang, N. P., Meyle, J., Murakami, S., Plemons, J., Romito, G. A., Shapira, L., Tatakis, D. N., Teughels, W., Trombelli, L., Walter, C., Wimmer, G., Xenoudi, P. and Yoshie, H. (2018) 'Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions', *Journal of Clinical Periodontology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 45, pp. S68–S77.

Chatzopoulos, G.-S., Doufexi, A.-E. and Kalogirou, F. (2016) 'Association of susceptible genotypes to periodontal disease with the clinical outcome and tooth survival after non-surgical periodontal therapy: A systematic review and meta-analysis', *Med Oral Patol Oral Cir Bucal Jan*, 121(1), pp. 14–29.

Chen, L., Li, H., Zhang, P. and Wang, S. (2012) 'Association Between Vitamin D Receptor Polymorphisms and Periodontitis: A Meta-Analysis', *Journal of Periodontology*. American Academy of Periodontology, 83(9), pp. 1095–1103.

Chen, S. C. Y., Constantinides, C., Keschull, M. and Papapanou, P. N. (2016) 'MicroRNAs regulate cytokine responses in gingival epithelial cells.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology, 84(12), pp. 3282–3289.

Chen, X., Huang, J., Zhong, L. and Ding, C. (2015) 'Quantitative Assessment of the Associations Between Interleukin-8 Polymorphisms and Periodontitis Susceptibility', *Journal of Periodontology*. American Academy of Periodontology, 86(2), pp. 292–300.

## Referencias bibliográficas

- Chi, P., Allis, C. D. and Wang, G. G. (2010)** 'Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers.', *Nature reviews. Cancer*. NIH Public Access, 10(7), pp. 457–69.
- Cho, M.-I. and Garant, P. R. (2000)** 'Development and general structure of the periodontium', *Periodontology 2000*. Munksgaard International Publishers, 24(1), pp. 9–27.
- Cho, Y., Kim, P., Kim, H., Seol, Y., Lee, Y., Ku, Y. and Rhyu, I. (2017)**. Transcriptomics and methylomics in chronic periodontitis with tobacco use: a pilot study. *Clinical Epigenetics* 10; 9:81.
- Choi, Y. S., Kim, Y. C., Ji, S. and Choi, Y. (2014)** 'Increased Bacterial Invasion and Differential Expression of Tight-Junction Proteins, Growth Factors, and Growth Factor Receptors in Periodontal Lesions', *Journal of Periodontology*, 85(8), pp. e313–e322.
- Christensen, B. B., Sternberg, C., Andersen, J. B., Eberl, L., Moller, S., Givskov, M. and Molin, S. (1998)** 'Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community.', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 64(6), pp. 2247–55.
- Chung, H. Y., Lee, E. K., Choi, Y. J., Kim, J. M., Kim, D. H., Zou, Y., Kim, C. H., Lee, J., Kim, H. S., Kim, N. D., Jung, J. H. and Yu, B. P. (2011)** 'Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases', *Journal of Dental Research*, 90(7), pp. 830–840.
- Ciancio, S. C., Neiders, M. E. and Hazen, S. P. (1967)** 'The principal fibers of the periodontal ligament', *Periodontics*, 5(2), pp. 76–81.
- Cimasoni, G. (1983)** 'Crevicular fluid updated.', *Monographs in oral science*, 12, p. III–VII, 1-152.
- Clark, S. J., Harrison, J. and Molloy, P. L. (1997)** 'Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation.', *Gene*, 195(1), pp. 67–71.
- Cleaton-Jones, P., Buskin, S. A. and Volchansky, A. (1978)** 'Surface ultrastructure of human gingiva', *Journal of Periodontal Research*. Blackwell Publishing Ltd, 13(4), pp. 367–371.
- Costerton, J. W., Ellis, B., Lam, K., Johnson, F. and Khoury, A. E. (1994)** 'Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM), 38(12), pp. 2803–9.
- Crotti, T., Smith, M. D., Hirsch, R., Soukoulis, S., Weedon, H., Capone, M., Ahern, M. J. and Haynes, D. (2003)** 'Receptor activator NF  $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis', *Journal of Periodontal Research*. Munksgaard International Publishers, 38(4), pp. 380–387.
- Dai, Y., Huang, Y.-S., Tang, M., Lv, T.-Y., Hu, C.-X., Tan, Y.-H., Xu, Z.-M. and Yin, Y.-B. (2007)** 'Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic

lupus erythematosus patients', *Lupus*. Sage PublicationsSage UK: London, England, 16(12), pp. 939–946.

**Dale, B. A.** (2002) 'Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease', *Periodontology 2000*. Munksgaard International Publishers, 30(1), pp. 70–78.

**Dastmalchi, R., Poison, A., Bouwsma, O. and Proskin, H.** (1990) 'Cementum thickness and mesial drift', *Journal of Clinical Periodontology*. Blackwell Publishing Ltd, 17(10), pp. 709–713.

**Deinzer, R., Förster, P., Fuck, L., Herforth, A., Stiller-Winkler, R. and Idel, H.** (1999) 'Increase of crevicular interleukin 1beta under academic stress at experimental gingivitis sites and at sites of perfect oral hygiene.', *Journal of clinical periodontology*, 26(1), pp. 1–8.

**Delaleu, N. and Bickel, M.** (2004) 'Interleukin-1 beta and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation.', *Periodontology 2000*, 35(1), pp. 42–52.

**Delima, A. J. and Van Dyke, T. E.** (2003) 'Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid', *Periodontology 2000*, 31(1), pp. 55–76.

**De Camargo Pereira, G., Guimarães, G. N., Planello, A. C., Santamaria, M. P., de Souza, A. P., Line, S. R. and Marques, M. R.** (2013) 'Porphyromonas gingivalis LPS stimulation downregulates DNMT1, DNMT3a, and JMJD3 gene expression levels in human HaCaT keratinocytes', *Clinical Oral Investigations*. Springer-Verlag, 17(4), pp. 1279–1285.

**De Faria Amormino, S. A., Arão, T. C., Saraiva, A. M., Gomez, R. S., Dutra, W. O., da Costa, J. E., de Fátima Correia Silva, J. and Moreira, P. R.** (2013) 'Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis', *Human Immunology*, 74(9), pp. 1231–1236.

**De-Gennaro, L. A.** (2006). Autoantibodies Directed to Extracellular Matrix Components in Patients With Different Clinical Forms of Periodontitis. *J Periodontol*. 77(12):2025-30. pp. 2025–30.

**Deshpande, R. G., Khan, M. and Genco, C. A.** (1999) 'Invasion strategies of the oral pathogen Porphyromonas gingivalis: Implications for cardiovascular disease', *Invasion and Metastasis*, 18(2), pp. 57–69.

**De Oliveira, N. F. P., Andia, D. C., Planello, A. C., Pasetto, S., Marques, M. R., Nociti, F. H., Line, S. R. P. and De Souza, A. P.** (2011) 'TLR2 and TLR4 gene promoter methylation status during chronic periodontitis', *Journal of Clinical Periodontology*. Blackwell Publishing Ltd, 38(11), pp. 975–983.

**De Souza, A. P., Planello, A. C., Marques, M. R., De Carvalho, D. D. and Line, S. R. P.** (2014) 'High-throughput DNA analysis shows the importance of methylation in the control of immune inflammatory gene transcription in chronic periodontitis.', *Clinical epigenetics*, 6(1), p. 15.

## Referencias bibliográficas

- Dolz, S. Górriz D, Tembl JI, Sánchez D, Fortea G, Parkhutik V, Lago A (2017).** Circulating MicroRNAs as novel biomarkers of stenosis progression in asymptomatic carotid stenosis. *Stroke*, 48(1), pp.10–16.
- Duan, P. and Bonewald, L. F. (2016)** The role of the wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 77(Pt A), 23-29.
- Duarte, P. M., da Rocha, M., Sampaio, E., Mestnik, M. J., Feres, M., Figueiredo, L. C., Bastos, M. F. and Faveri, M. (2010)** ‘Serum Levels of Cytokines in Subjects With Generalized Chronic and Aggressive Periodontitis Before and After Non-Surgical Periodontal Therapy: A Pilot Study’, *Journal of Periodontology*. American Academy of Periodontology, 81(7), pp. 1056–1063.
- Ebersole, J. L. (2003)** ‘Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications’, *Periodontology 2000*, 31(1), pp. 135–166.
- Ekuni, D., Firth, J. D. and Putnins, E. E. (2006)** ‘Regulation of epithelial cell growth factor receptor protein and gene expression using a rat periodontitis model’, *Journal of Periodontal Research*, 41(4), pp. 340–349.
- Eley, B. M. and Cox, S. W. (2003)** ‘Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid’, *Periodontology 2000*, 31(1), pp. 105–124.
- Embery, G., Waddington, R. J., Hall, R. C. and Last, K. S. (2000)** ‘Connective tissue elements as diagnostic aids in periodontology’, *Periodontology 2000*. Munksgaard International Publishers, 24(1), pp. 193–214.
- Figuro, E., Carrillo-De-Albornoz, A., Herrera, D. and Bascones-Martínez, A. (2010)** ‘Gingival changes during pregnancy: I. Influence of hormonal variations on clinical and immunological parameters’, *Journal of Clinical Periodontology*, 37(3), pp. 220–229.
- Filoche, S., Wong, L. and Sissons, C. H. (2010)** ‘Oral Biofilms: Emerging Concepts in Microbial Ecology’, *Journal of Dental Research*. SAGE Publications, 89(1), pp. 8–18.
- Fives-Taylor, P., Meyer, D. and Mintz, K. (1995)** ‘Characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of and adhesion to cultured epithelial cells.’, *Advances in dental research*, 9(1), pp. 55–62.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. and Kjelleberg, S. (2016)** ‘Biofilms: an emergent form of bacterial life’, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research, 14(9), pp. 563–575.
- Flemmig, T. F. (1999)** ‘Periodontitis’, *Annals of Periodontology*, 4(1), pp. 32–37.
- Foster, B. L. (2017)** ‘On the discovery of cementum’, *Journal of Periodontal Research*.
- Freire, M. O. and Van Dyke, T. E. (2013)** ‘Natural resolution of inflammation’, *Periodontology 2000*, 63(1), pp. 149–164.



**Friedman, J., Hastie, T., & Tibshirani, R. (2010).** Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *Journal of Statistical Software*, 33(1), 1–22.

**Galli, C., Passeri, G. and Macaluso, G. M. (2011)** ‘FoxOs, Wnts and oxidative stress-induced bone loss: New players in the periodontitis arena?’, *Journal of Periodontal Research*, pp. 397–406.

**García-Gimenez JL, Hermida-Bas T, Pallardó-Calatayud FV, Hervás-Marín D, Mena-Mollá S (2016).** Kit and method for the diagnosis/prognosis of idiopathic scoliosis. WO2016202944 (A1).

**García-Gimenez J.L. (2016)** Epigenetic Biomarkers and Diagnostics. London: Elsevier.

**García-Giménez, J. L., Seco-Cervera, M., Tollefsbol, T. O., Romá-Mateo, C., Peiró-Chova, L., Lapunzina, P. and Pallardó, F. V. (2017)** ‘Epigenetic biomarkers: Current strategies and future challenges for their use in the clinical laboratory’, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 54(7–8), pp. 529–550.

**Gargiulo, A. W., Wentz, F. M. and Orban, B. (1961)** ‘Dimensions and Relations of the Dentogingival Junction in Humans’, *Journal of Periodontology*, 32(3), pp. 261–267.

**Garlet GP1, Giozza SP, Silveira EM, Claudino M, Santos SB, Avila-Campos MJ, Martins W Jr, Cardoso CR, Trombone AP, Campanelli AP, Carvalho EM, Silva JS. (2010)** ‘Association of human T lymphotropic virus 1 amplification of periodontitis severity with altered cytokine expression in response to a standard periodontopathogen infection’, *Clin Infect Dis* 1;50(3):e11-8.

**Gemmell, E., Marshal, R. I. and Seymour, G. J. (1997)** ‘Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease’, *Periodontology 2000*. Blackwell Publishing Ltd, 14(1), pp. 112–143.

**Genco, R. J., Grossi, S. G., Ho, A., Nishimura, F. and Murayama, Y. (2005)** ‘A Proposed Model Linking Inflammation to Obesity, Diabetes, and Periodontal Infections’, *Journal of Periodontology*. American Academy of Periodontology, 76(11–s), pp. 2075–2084.

**Genetos, D. C., Rao, R. R. and Vidal, M. A. (2010)** ‘Betacellulin inhibits osteogenic differentiation and stimulates proliferation through HIF-1 $\alpha$ ’, *Cell Tissue Res*. 340(1):81-9).

**Ghosh A, Chen TC, Kapila YL (2010).** Proapoptotic fibronectin fragment induces the degradation of ubiquitinated p53 via proteasomes in periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2010, 45(4):481-7.

**Ghotloo S, Motedayyen H, Amani D, Saffari M, Sattari M (2018).** Assessment of microRNA-146a in generalized aggressive periodontitis and its association with disease severity. *Journal of Periodontal Research*, 54:27-32.

## Referencias bibliográficas

- Giannobile, W. V., Al-Shammari, K. F. and Sarment, D. P. (2003)** 'Matrix molecules and growth factors as indicators of periodontal disease activity', *Periodontology 2000*, 31(1), pp. 125–134.
- Glass, D. A., Bialek, P., Ahn, J. D., Starbuck, M., Patel, M. S., Clevers, H., Taketo, M. M., Long, F., McMahon, A. P., Lang, R. A. and Karsenty, G. (2005)** 'Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation'. *Developmental Cell* 8, 751–764.
- Gölz, L., Memmert, S., Rath-Deschner, B., Jäger, A., Appel, T., Baumgarten, G., Götz, W. and Frede, S. (2015)** 'Hypoxia and *P. gingivalis* synergistically induce HIF-1 and NF- $\kappa$ B activation in PDL cells and periodontal diseases', *Mediators of Inflammation*, 2015.
- Goodson, J. M. (2003)** 'Gingival crevice fluid flow', *Periodontology 2000*, 31(1), pp. 43–54.
- Grant, D. A. and Bernick, S. (1969)** 'A Possible Continuity Between Epithelial Rests and Epithelial Attachment in Miniature Swine', *Journal of Periodontology*, 40(2), pp. 87–95.
- Grant, M. M. (2012)** 'What do 'omic technologies have to offer periodontal clinical practice in the future?', *Journal of Periodontal Research*. Blackwell Publishing Ltd, 47(1), pp. 2–14.
- Gray, S. G. (2011)** 'Epigenetic treatment of neurological disease', *Epigenomics*. Future Medicine Ltd London, UK , 3(4), pp. 431–450.
- Gräber, H., Conrads, G., Wilharm, J. and Lampert, F. (1999)**. Role of interactions between integrins and extracellular matrix components in healthy epithelial tissue and establishment of a long junctional epithelium during periodontal wound healing: a review. *J Periodontol*. 70(12):1511-22.
- Greenstein, G. and Hart, T. C. (2002)** 'A Critical Assessment of Interleukin-1 (IL-1) Genotyping When Used in a Genetic Susceptibility Test for Severe Chronic Periodontitis', *Journal of Periodontology*. American Academy of Periodontology 737 N. Michigan Avenue, Suite 800 Chicago, IL 60611-2690 USA , 73(2), pp. 231–247.
- Griffiths, G. S. (2003)** 'Formation, collection and significance of gingival crevice fluid', *Periodontology 2000*, 31(1), pp. 32–42.
- Griffiths, G. S., Wilton, J. M. and Curtis, M. A. (1992)** 'Contamination of human gingival crevicular fluid by plaque and saliva.', *Archives of oral biology*, 37(7), pp. 559–64.
- Groeger, S. E. and Meyle, J. (2015)** 'Epithelial barrier and oral bacterial infection', *Periodontology 2000*, 69(1), pp. 46–67.
- Györfi, A., Fazekas, A. and Rosivall, L. (1992)** 'Neurogenic inflammation and the oral mucosa', *Journal of Clinical Periodontology*. Blackwell Publishing Ltd, 19(10), pp. 731–736.
- Hajishengallis, G. (2014)** 'Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response.', *Trends in immunology*, 35(1), pp. 3–11.

**Hallmon, W. W.** (1999) 'Occlusal Trauma: Effect and Impact on the Periodontium', *Annals of Periodontology*, 4(1), pp. 102–107.

**Han, M. xuan, Ding, C. and Kyung, H. M.** (2015) 'Genetic polymorphisms in pattern recognition receptors and risk of periodontitis: Evidence based on 12,793 subjects', *Human Immunology*, 76(7), pp. 496–504.

**Hannas, A. R., Pereira, J. C., Granjeiro, J. M. and Tjäderhane, L.** (2007) 'The role of matrix metalloproteinases in the oral environment', *Acta Odontologica Scandinavica*. Taylor & Francis, 65(1), pp. 1–13.

**Harrison, J. W. and Roda, R. S.** (1995) 'Intermediate cementum', *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 79(5), pp. 624–633.

**Hasturk, H., Kantarci, A., Goguet-Surmenian, E., Blackwood, A., Andry, C., Serhan, C. N. and Van Dyke, T. E.** (2007) 'Resolvin E1 Regulates Inflammation at the Cellular and Tissue Level and Restores Tissue Homeostasis In Vivo', *The Journal of Immunology*, 179(10).

**Hatakeyama, S., Yaegashi, T., Oikawa, Y., Fujiwara, H., Mikami, T., Takeda, Y. and Satoh, M.** (2006) 'Expression pattern of adhesion molecules in junctional epithelium differs from that in other gingival epithelia', *Journal of Periodontal Research*, 41(4), pp. 322–328.

**Heins, P. J. and Wieder, S. M.** (1986) 'A Histologic Study of the Width and Nature of Inter-radicular Spaces in Human Adult Pre-molars and Molars', *Journal of Dental Research*. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 65(6), pp. 948–951.

**He, L. and Hannon, G. J.** (2004) 'MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 5(7), pp. 522–531.

**Herrera, D., Alonso, B., de Arriba, L., Santa Cruz, I., Serrano, C. and Sanz, M.** (2014) 'Acute periodontal lesions', *Periodontology 2000*, 65(1), pp. 149–177.

**Herrera, M. T., Wang, Q., Vachon, E., Suzuki, T., Chow, C. W., Wang, Y., Hong, O., Villar, J., McCulloch, C. A. G. and Downey, G. P.** (2006) 'Tyrosine phosphatase SHP-2 regulates IL-1 signaling in fibroblasts through focal adhesions', *Journal of Cellular Physiology*, 207(1), pp. 132–143.

**Hillis, G. S. and MacLeod, A. M.** (1996) 'Integrins and Disease', *Clinical Science*, 91(6).

**Hintermann, E., Haake, S. K., Christen, U., Sharabi, A. and Quaranta, V.** (2002) 'Discrete proteolysis of focal contact and adherens junction components in *Porphyromonas gingivalis*-infected oral keratinocytes: A strategy for cell adhesion and migration disabling', *Infection and Immunity*, 70(10), pp. 5846–5856.

**Hong, S., Gronert, K., Devchand, P. R., Moussignac, R.-L. and Serhan, C. N.** (2003) 'Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 278(17), pp. 14677–87.

## Referencias bibliográficas

**Hongo, S., Yamamoto, T., Yamashiro, K., Shimoe, M., Tomikawa, K., Ugawa, Y., Kochi, S., Ideguchi, H., Maeda, H. and Takashiba, S. (2016).** Smad2 overexpression enhances adhesion of gingival epithelial cells. *Archives of Oral Biology*. Elsevier Ltd, 71, pp. 46–53.

**Huang, S., Lu, F., Zhang, Z., Yang, X. and Chen, Y. (2011)** ‘The Role of Psychologic Stress-Induced Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  in Rat Experimental Periodontitis’, *Journal of Periodontology*, 82(6), pp. 934–941.

**Ishida K, Kobayashi T, Ito S, Komatsu Y, Yokoyama T, Okada M, Abe A, Murasawa A, Yoshie H (2012).** Interleukin-6 Gene Promoter Methylation in Rheumatoid Arthritis and Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 83: 917-925.

**Jepsen, S., Caton, J. G., Albandar, J. M., Bissada, N. F., Bouchard, P., Cortellini, P., Demirel, K., de Sanctis, M., Ercoli, C., Fan, J., Geurs, N. C., Hughes, F. J., Jin, L., Kantarci, A., Lalla, E., Madianos, P. N., Matthews, D., McGuire, M. K., Mills, M. P., Preshaw, P. M., Reynolds, M. A., Sculean, A., Susin, C., West, N. X. and Yamazaki, K. (2018)** ‘Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions’, *Journal of Periodontology*. Wiley-Blackwell, 89, pp. S237–S248.

**Jernberg, G. R., Bakdash, M. B. and Keenan, K. M. (1983)** ‘Relationship Between Proximal Tooth Open Contacts and Periodontal Disease’, *Journal of Periodontology*, 54(9), pp. 529–533.

**Jiang, X. and Chen, Z. J. (2012)** ‘The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion’, *Nat. Rev. Immunol.* 2011, 12, 35–48.

**Jones, J. C. R., Hopkinson, S. B. and Goldfinger, L. E. (1998)** ‘Structure and assembly of hemidesmosomes’, *BioEssays*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 20(6), pp. 488–494.

**Jorde, L. B., Carey, J. C., White, R. L. (1996)** *Medical Genetics*. Madrid: Ed, Mosby.

**Kadkhodazadeh, M., Jafari, A. R., Amid, R., Ebadian, A. R., Alipour, M. M., Mollaverdi, F. and Lafzi, A. (2013)** ‘MiR146a and MiR499 gene polymorphisms in Iranian periodontitis and peri-implantitis patients.’, *Journal of long-term effects of medical implants*. Begel House Inc., 23(1), pp. 9–16.

**Kadowaki, T. and Yamamoto, K. (2003)** ‘Suppression of Virulence of *Porphyromonas gingivalis* by Potent Inhibitors Specific for Gingipains’, *Current Protein & Peptide Science*, 4(6), pp. 451–458.

**Kang, G. H., Lee, H. J., Hwang, K. S., Lee, S., Kim, J.-H. and Kim, J.-S. (2003)** ‘Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation.’, *The American journal of pathology*. American Society for Investigative Pathology, 163(4), pp. 1551–6.

**Karimbux, N. Y., Saraiya, V. M., Elangovan, S., Allareddy, V., Kinnunen, T., Kornman, K. S. and Duff, G. W. (2012)** ‘Interleukin-1 Gene Polymorphisms and Chronic Periodontitis in

Adult Whites: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Journal of Periodontology*. American Academy of Periodontology, 83(11), pp. 1407–1419.

Kassebaum, N. J., Bernabe, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C. J. L. and Marcenes, W. (2014) 'Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010: A Systematic Review and Meta-regression', *Journal of Dental Research*. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, 93(11), pp. 1045–1053.

Kato, K., Hara, A., Kuno, T., Mori, H., Yamashita, T., Toida, M. and Shibata, T. (2006) 'Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa.', *Journal of cancer research and clinical oncology*, 132(11), pp. 735–43.

Katz, J., Sambandam, V., Wu, J. H., Michalek, S. M. and Balkovetz, D. F. (2000) 'Characterization of Porphyromonas gingivalis-induced degradation of epithelial cell junctional complexes', *Infection and Immunity*, 68(3), pp. 1441–1449.

Katz, J., Yang, Q. B., Zhang, P., Potempa, J., Travis, J., Michalek, S. M. and Balkovetz, D. F. (2002) 'Hydrolysis of epithelial junctional proteins by Porphyromonas gingivalis gingipains', *Infection and Immunity*, 70(5), pp. 2512–2518.

Kieffer, A. E., Goumon, Y., Ruh, O., Chasserot-Golaz, S., Nullans, G., Gasnier, C., Aunis, D. and Metz-Boutigue, M. H. (2003) 'The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities.'. *FASEB J.* 2003 Apr; 17(6):776-8.

Kim, H. R., Roe, J. S., Lee, J. E., Cho, E. J. and Youn, H. D. (2013) 'P53 regulates glucose metabolism by miR-34a', *Biochemical and Biophys Res Commun.* 437(2):225-231.

Kim, T. H., Choi, S. J., Lee, Y. H., Song, G. G. and Ji, J. D. (2012) 'Combined therapeutic application of mTOR inhibitor and vitamin D3 for inflammatory bone destruction of rheumatoid arthritis', *Medical Hypotheses*. Elsevier Ltd, 79(6), pp. 757–760.

Kim, Y. S., Shin, S. I., Kang, K. L., Chung, J. H., Herr, Y., Bae, W. J. and Kim, E. C. (2012) 'Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the production of MMPs and prostaglandin E2 by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  up-regulation in human periodontal ligament cells', *Journal of Periodontal Research*, 47(6), pp. 719–728.

Kobayashi T, Ishida K, Yoshie H (2016). Increased expression of interleukin-6 (IL-6) gene transcript in relation to IL-6 promoter hypomethylation in gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *Archives Oral Biology*, 69: 89-94.

Kochi, S., Yamashiro, K., Hongo, S., Yamamoto, T., Ugawa, Y., Shimoe, M., Kawamura, M., Hirata-Yoshihara, C., Ideguchi, H., Maeda, H. and Takashiba, S. (2017) 'Aggregatibacter actinomycetemcomitans regulates the expression of integrins and reduces cell adhesion via integrin  $\alpha 5$  in human gingival epithelial cells', *Molecular and Cellular Biochemistry*. Springer US, 436(1–2), pp. 39–48.

Kojima A, Kobayashi T, Ito S, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H (2016). Tumor necrosis factor- $\alpha$  gene promoter methylation in Japanese adults with chronic periodontitis and rheumatoid arthritis. *Journal of Periodontal Research*, 51:350-358.

**Kozomara A., Griffiths-Jones S. (2014)** miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research* 42: D68-D73.

**Kornberg, R. D. (1977)** 'Structure of Chromatin', *Annual Review of Biochemistry*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA , 46(1), pp. 931–954.

**Kornman, K. S., Crane, A., Wang, H.-Y., Giovine, F. S. d., Newman, M. G., Pirk, F. W., Wilson, T. G., Higginbottom, F. L. and Duff, G. W. (1997)** 'The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease', *Journal of Clinical Periodontology*. Blackwell Publishing Ltd, 24(1), pp. 72–77.

**Koshizuka, K, Hanazawa T, Kikkawa N, Arai T, Okato A, Kurozumi A, Kato M, Katada K, Okamoto Y, Seki N(2017)**. Regulation of ITGA3 by the anti-tumor miR-199 family inhibits cancer cell migration and invasion in head and neck cancer. *Cancer Science*, 108(8), pp.1681–1692.

**Kwok, V. and Caton, J. G. (2007)** 'Commentary: Prognosis Revisited: A System for Assigning Periodontal Prognosis', *Journal of Periodontology*. Wiley-Blackwell, 78(11), pp. 2063–2071.

**Lamster, I. B. and Ahlo, J. K. (2007)** 'Analysis of Gingival Crevicular Fluid as Applied to the Diagnosis of Oral and Systemic Diseases', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098(1), pp. 216–229.

**Larjava H1, Koivisto L2, Heino J3, Häkkinen L2. (2014)** `Integrins in periodontal disease.´*Exp Cell Res*. 15;325(2):104-10.

**Lee, Y. H., Na, H. S., Jeong, S. Y., Jeong, S. H., Park, H. R. and Chung, J. (2011)** 'Comparison of inflammatory microRNA expression in healthy and periodontitis tissues', *Biocell*, 35(2), pp. 43–49.

**Li, J.-P., Li, F. Y. L., Xu, A., Cheng, B., Tsao, S. W., Fung, M.-L. and Leung, W. K. (2012)** 'Lipopolysaccharide and Hypoxia-Induced HIF-1 Activation in Human Gingival Fibroblasts', *Journal of Periodontology*, 83(6), pp. 816–824.

**Li J, Wang R, Ge Y, Chen D, Wu B, Fang F (2018)**. Assessment of microRNA-144-5p and its putative targets in inflamed gingiva from chronic periodontitis patients. *Journal of Periodontal Research*; 54: 266-77.

**Li, X., Chang, B., Wang, B., Bu, W., Zhao, L., Liu, J., Meng, L., Wang, L., Xin, Y., Wang, D., Tang, Q., Zheng, C. and Sun, H. (2017)** 'Rapamycin promotes osteogenesis under inflammatory conditions', *Molecular Medicine Reports*, 16(6), pp. 8923–8929.

**Liang, L., Zhou, W., Yang, N., Yu, J. and Liu, H. (2016)** 'ET-1 Promotes Differentiation of Periodontal Ligament Stem Cells into Osteoblasts through ETR, MAPK, and Wnt/  $\beta$  - Catenin Signaling Pathways under Inflammatory Microenvironment', *Mediators of Inflammation*, 2016, p. 8467849.

Liu, J., Zeng, J., Wang, X., Zheng, M. and Luan, Q. (2018) 'P53 mediates lipopolysaccharide-induced inflammation in human gingival fibroblasts', *Journal of Periodontology*, 89(9), pp. 1142–1151.

Liu L, Li C, Cai X, Xiang J, Cao Z, Dong W. (2010) The temporal expression and localization of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) during the development of periodontitis in an animal model. *J Periodontol Res.* 45:541-549.

Liu, X., Zhang, Z., Pan, S., Shang, S. and Li, C. (2018) 'Interaction between the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and the EMMPRIN/MMP-2, 9 route in periodontitis', *Journal of Periodontal Research*, 53(5), pp. 842–852.

Liu, Y., Liu, W., Hu, C., Xue, Z., Wang, G., Ding, B., Luo, H., Tang, L., Kong, X., Chen, X., Liu, N., Ding, Y. and Jin, Y. (2011) 'MiR-17 modulates osteogenic differentiation through a coherent feed-forward loop in mesenchymal stem cells isolated from periodontal ligaments of patients with periodontitis', *Stem Cells*, 29(11), pp. 1804–1816.

Löe, H. and Holm-Pedersen, P. (1965) 'Absence and presence of fluid from normal and inflamed gingivae.', *Periodontics*, 3(3), pp. 171–7.

Löe, H., Anerud, A., Boysen, H. and Morrison, E. (1986) 'Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age.', *Journal of clinical periodontology*, 13(5), pp. 431–45.

Loo, W. T. Y., Jin, L., Cheung, M. N. B., Wang, M. and Chow, L. W. C. (2010) 'Epigenetic change in E-cadherin and COX-2 to predict chronic periodontitis.', *Journal of translational medicine*, 8(1), p. 110.

Lowenguth, R. A. and Blieden, T. M. (1993) 'Periodontal regeneration: root surface demineralization', *Periodontology 2000*. Blackwell Publishing Ltd, 1(1), pp. 54–68.

Lu, C., Tej, S. S., Luo, S., Haudenschild, C. D., Meyers, B. C. and Green, P. J. (2005) 'Elucidation of the small RNA component of the transcriptome.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 309(5740), pp. 1567–9.

Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. and Richmond, T. J. (1997) 'Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution', *Nature*. Nature Publishing Group, 389(6648), pp. 251–260.

Lun, ATL, Chen, Y, and Smyth, GK (2016). It's delicious: a recipe for differential expression analyses of RNA-seq experiments using quasi-likelihood methods in edgeR. *Methods in Molecular Biology* 1418, 391–416.

Machtei, E. E., Mahler, D., Sanduri, H. and Peled, M. (2004) 'The Effect of Menstrual Cycle on Periodontal Health', *Journal of Periodontology*, 75(3), pp. 408–412.

MacNaul, K. L., Chartrain, N., Lark, M., Tocci, M. J. and Hutchinson, N. I. (1990) 'Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of

interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression.', *The Journal of biological chemistry*, 265(28), pp. 17238–45.

**Maekawa, T., Krauss, J. L., Abe, T., Jotwani, R., Triantafilou, M., Triantafilou, K., Hashim, A., Hoch, S., Curtis, M. A., Nussbaum, G., Lambris, J. D. and Hajishengallis, G. (2014)** 'Porphyromonas gingivalis manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis'. *Cell Host Microbe* 2014, 15, 768–778.

**Maekawa, T., Kulwattanaporn, P., Hosur, K., Domon, H., Oda, M., Terao, Y., Maeda, T. and Hajishengallis, G. (2017)** 'Differential Expression and Roles of Secreted Frizzled-Related Protein 5 and the Wingless Homolog Wnt5a in Periodontitis', *Journal of Dental Research*, 96(5), pp. 571–577.

**Mäkälä, M., Salo, T., Uitto, V. J. and Larjava, H. (1994)** 'Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the Oral Cavity: Cellular Origin and Relationship to Periodontal Status', *J Dent Res.* 73(8):1397-406.

**Martelli-Junior, H., Cotrim, P., Graner, E., Sauk, J. J. and Coletta, R. D. (2003)** 'Effect of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1, Interleukin-6, and Interferon- $\gamma$  on the Expression of Type I Collagen, Heat Shock Protein 47, Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2 by Fibroblasts from Normal Gingiva and Hereditary Gingival Fibromatosis', *Journal of Periodontology. American Academy of Periodontology* 737 N. Michigan Avenue, Suite 800 Chicago, IL 60611-2690 USA , 74(3), pp. 296–306.

**Martinez, G. L., Koury, J. C., Brito, F., Fischer, R. G., Gustafsson, A. and Figueredo, C. M. (2014)** 'The impact of non-surgical periodontal treatment on serum levels of long chain-polyunsaturated fatty acids: A pilot randomized clinical trial', *Journal of Periodontal Research*, 49(2), pp. 268–274.

**Matias, M. ., Li, H., Young, W. . and Bartold, P. . (2003)**'Immunohistochemical localisation of extracellular matrix proteins in the periodontium during cementogenesis in the rat molar', *Archives of Oral Biology*, 48(10), pp. 709–716.

**McCawley, L. J., Li, S., Wattenberg, E. V. and Hudson, L. G. (1999)** 'Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway: A mechanism underlying receptor tyrosine kinase specificity for matrix metalloproteinase-9 induction and cell migration', *J Biol Chem.* 274(7):4347-53.

**McCulloch, C. A. G., Lekic, P. and McKee, M. D. (2000)** 'Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament', *Periodontology 2000. Munksgaard International Publishers*, 24(1), pp. 56–72.

**McCulloch, C. A. and Melcher, A. H. (1983)** 'Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice.', *The American journal of anatomy*, 167(1), pp. 43–58.

**McMahon, B. and Godson, C. (2004)** 'Lipoxins: endogenous regulators of inflammation', *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 286(2).



- Melcher, A. H.** (1976) 'On the Repair Potential of Periodontal Tissues', *Journal of Periodontology*, 47(5), pp. 256–260.
- Meng, H. X.** (1999) 'Periodontal abscess.', *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*, 4(1), pp. 79–83.
- Meng, H. X.** (1999) 'Periodontic-Endodontic Lesions', *Annals of Periodontology*, 4(1), pp. 84–89.
- Meyle, J. and Chapple, I.** (2015) 'Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis', *Periodontology 2000*, 69(1), pp. 7–17.
- Michalowicz, B. S., Aeppli, D., Virag, J. G., Klump, D. G., Hinrichs, E., Segal, N. L., Bouchard, T. J. and Pihlstrom, B. L.** (1991) 'Periodontal Findings in Adult Twins', *Journal of Periodontology*, 62(5), pp. 293–299.
- Micó-Martínez, P., García-Giménez, J.L., Seco-Cervera, M., López-Roldán, A., Almiñana-Pastor, P.J., Alpiste-Illueca, F., Pallardó, F.V.** (2018) 'MiR-1226 detection in GCF as potential biomarker of chronic periodontitis: A pilot study', *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 23(3), pp. e308–e314.
- Miranda, T. S., Napimoga, M. H., Feres, M., Marins, L. M., da Cruz, D. F., da Silva, H. D. P. and Duarte, P. M.** (2018) 'Antagonists of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in the periodontitis associated with type 2 diabetes and smoking', *Journal of Clinical Periodontology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 45(3), pp. 293–302.
- Mishima, E. and Sharma, A.** (2011) 'Tannerella forsythia invasion in oral epithelial cells requires phosphoinositide 3-Kinase activation and clathrin-mediated endocytosis', *Microbiology*, 157(8), pp. 2382–2391.
- Mombelli, A., Casagni, F. and Madianos, P. N.** (2002) 'Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review', *Journal of Clinical Periodontology*. Blackwell Science Ltd, 29(s3), pp. 10–21.
- Motedayyen, H., Ghotloo, S., Saffari, M., Sattari, M. and Amid, R.** (2015) 'Evaluation of MicroRNA-146a and Its Targets in Gingival Tissues of Patients With Chronic Periodontitis', *Journal of Periodontology*. American Academy of Periodontology, 86(12), pp. 1380–1385.
- Müller-Glauser, W. and Schroeder, H. E.** (1982) 'The Pocket Epithelium: A Light- and Electronmicroscopic Study', *Journal of Periodontology*, 53(3), pp. 133–144.
- Nakayama, M., Inoue, T., Naito, M., Nakayama, K. and Ohara, N.** (2015) 'Attenuation of the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling pathway by porphyromonas gingivalis gingipains RgpA, RgpB, and Kgp', *Journal of Biological Chemistry*, 290(8), pp. 5190–5202.
- Nakayama, M., Ohara, N.** (2017) Novel function of Porphyromonas gingivalis gingipains in the PI3K/Akt signaling pathway. *Journal of Oral Biosciences*. 59(3), pp.131–134.

**Nagayama, T., Seiryu, M., Deguchi, T., Kano, M., Suzuki, T., Takano- Yamamoto, T., & Ichikawa, H. (2012).** Increase of CGRP-containing nerve fibers in the rat periodontal ligament after luxation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32(3), 391–397.

**Nagarakanti, S., Ramya, S., Babu, P., Arun, K. V and Sudarsan, S. (2007)** ‘Differential expression of E-cadherin and cytokeratin 19 and net proliferative rate of gingival keratinocytes in oral epithelium in periodontal health and disease.’, *The Journal of periodontology*, 78(November), pp. 2197–2202.

**Nahid, M.A, Rivera M, Lucas A, Chan EK, Kesavalu L (2011).** Polymicrobial infection with periodontal pathogens specifically enhances microRNA miR-146a in ApoE<sup>-/-</sup>-mice during experimental periodontal disease S. R. Blanke, ed. *Infection and Immunity*, 79(4), pp.1597–1605.

**Nakasa, T., Miyaki, S., Okubo, A., Hashimoto, M., Nishida, K., Ochi, M. and Asahara, H. (2008)** ‘Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue.’, *Arthritis and rheumatism. NIH Public Access*, 58(5), pp. 1284–92.

**Nanci, A. and Bosshardt, D. D. (2006)** ‘Structure of periodontal tissues in health and disease\*’, *Periodontology 2000. Munksgaard International Publishers*, 40(1), pp. 11–28.

**Napimoga, M. H., Nametala, C., Da Silva, F. L., Miranda, T. S., Bossonaro, J. P., Demasi, A. P. D. and Duarte, P. M. (2014)** ‘Involvement of the Wnt- $\beta$ -catenin signalling antagonists, sclerostin and dickkopf-related protein 1, in chronic periodontitis’, *Journal of Clinical Periodontology*, 41(6), pp. 550–557.

**Naqvi AR, Brambila MF, Martínez G, Chapa G, Nares S (2019).** Dysregulation of human miRNAs and increased prevalence of HHV miRNAs in obese periodontitis subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, 46:51-61.

**Newman, M. G., Takei, H. H., Klokkevold, P. R. and Carranza, F. A. (2014)** Carranza’s *Clinical Periodontology 11th*. Philadelphia: Ed. Elsevier.

**Neuvald, L. and Consolaro, A. (2000)** ‘Cemento-enamel Junction: Microscopic Analysis and External Cervical Resorption’, *Journal of Endodontics*, 26(9), pp. 503–508.

**Ng, K.-T., Li, J.-P., Ng, K. M., Tipoe, G. L., Leung, W. K. and Fung, M.-L. (2011)** ‘Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  in Human Periodontal Tissue’, *Journal of Periodontology*, 82(1), pp. 136–141.

**Nibali, L., Di Iorio, A., Tu, Y.-K. and Vieira, A. R. (2017)** ‘Host genetics role in the pathogenesis of periodontal disease and caries’, *Journal of Clinical Periodontology*, 44(S18), pp. S52–S78.

**Nichols, F. C., Levinbook, H., Shnaydman, M. and Goldschmidt, J. (2001)** ‘Prostaglandin E<sub>2</sub> secretion from gingival fibroblasts treated with interleukin-1 $\beta$ : Effects of lipid extracts

from *Porphyromonas gingivalis* or calculus', *Journal of Periodontal Research*, 36(3), pp. 142–152.

**Nikolopoulos, G. K., Dimou, N. L., Hamodrakas, S. J. and Bagos, P. G. (2008)** 'Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls', *Journal of Clinical Periodontology*. Blackwell Publishing Ltd, 35(9), pp. 754–767.

**Nilsson, B. O. (2007)** 'Modulation of the inflammatory response by estrogens with focus on the endothelium and its interactions with leukocytes', *Inflammation Research*, 56(7), pp. 269–273.

**Noguchi, K. and Ishikawa, I. (2007)** 'The roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E<sub>2</sub> in periodontal disease', *Periodontology 2000*, 43(1), pp. 85–101.

**Novak, M. J. (1999)** 'Necrotizing Ulcerative Periodontitis', *Annals of Periodontology*, 4(1), pp. 74–77.

**Nuñez, J., Sanz-Blasco, S., Vignoletti, F., Muñoz, F., Caffesse, R. G., Sanz, M., Villalobos, C. and Nuñez, L. (2010)** '17 $\beta$ -Estradiol Promotes Cementoblast Proliferation and Cementum Formation in Experimental Periodontitis', *Journal of Periodontology*, 81(7), pp. 1064–1074.

**Nussbaum, G. and Shapira, L. (2011)** 'How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis?', *Journal of Clinical Periodontology*, 38(SUPPL. 11), pp. 49–59.

**Offenbacher, S., Barros, S., Mendoza, L., Mauriello, S., Preisser, J., Moss, K., de Jager, M. and Aspiras, M. (2010)** 'Changes in gingival crevicular fluid inflammatory mediator levels during the induction and resolution of experimental gingivitis in humans.', *Journal of clinical periodontology*. NIH Public Access, 37(4), pp. 324–33.

**Offenbacher, S., Odle, B. M. and van Dyke, T. E. (1986)** 'The use of crevicular fluid prostaglandin E<sub>2</sub> levels as a predictor of periodontal attachment loss', *Journal of Periodontal Research*. 21: 101–112.

**Ogata, Y., Matsui, S., Kato, A., Zhou, L., Nakayama, Y. and Takai, H. (2014)** 'MicroRNA expression in inflamed and noninflamed gingival tissues from Japanese patients', *Journal of oral science*. Nihon University School of Dentistry, 56(4), pp. 253–260.

**Oliveira, N. F. P., Damm, G. R., Andia, D. C., Salmon, C., Nociti, F. H., Line, S. R. P. and De Souza, A. P. (2009)** 'DNA methylation status of the IL8 gene promoter in oral cells of smokers and non-smokers with chronic periodontitis', *Journal of Clinical Periodontology*. Blackwell Publishing Ltd, 36(9), pp. 719–725.

**Olsen, I. and Nichols, F. C. (2018)** 'Are sphingolipids and serine dipeptide lipids underestimated virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*?', *Infection and Immunity*, 86(7), pp. 1–26.

## Referencias bibliográficas

**Olsson, M., Lindhe, J. and Marinello, C. P. (1993)** 'On the relationship between crown form and clinical features of the gingiva in adolescents', *Journal of Clinical Periodontology*. Blackwell Publishing Ltd, 20(8), pp. 570–577.

**Overall, C. M. (1994)** 'Regulation of Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase Expression', *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Ltd, 732(1 Inhibition of), pp. 51–64.

**Ozturk, A. and Vieira, A. R. (2009)** 'TLR4 as a risk factor for periodontal disease: a reappraisal', *Journal of Clinical Periodontology*. Blackwell Publishing Ltd, 36(4), pp. 279–286.

**Page, R. C. (1991)** 'The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease.', *Journal of periodontal research*, 26(3 Pt 2), pp. 230–42.

**Page, R. C. (1992)** 'Host Response Tests for Diagnosing Periodontal Diseases', *Journal of Periodontology*, 63(4s), pp. 356–366.

**Page, R. C. and Beck, J. D. (1997)** 'Risk assessment for periodontal diseases\*', *International Dental Journal*. Blackwell Publishing Ltd, 47(2), pp. 61–87.

**Page, R. C. and Schroeder, H. E. (1981)** 'Current Status of the Host Response in Chronic Marginal Periodontitis', *Journal of Periodontology*, 52(9), pp. 477–491.

**Page, R. C. and Kornman, K. S. (1997)** 'The pathogenesis of human periodontitis: an introduction.', *Periodontology 2000*, 14, pp. 9–11.

**Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kebschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., Loos, B. G., Machtei, E., Meng, H., Mombelli, A., Needleman, I., Offenbacher, S., Seymour, G. J., Teles, R. and Tonetti, M. S. (2018)** 'Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions', *Journal of Periodontology*. Wiley-Blackwell, 89, pp. S173–S182.

**Park, J., Min, J. S., Kim, B., Chae, U. Bin, Yun, J. W., Choi, M. S., Kong, I. K., Chang, K. T. and Lee, D. S. (2015)** 'Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF- $\kappa$ B pathways', *Neuroscience Letters*. 584:191–196.

**Park, S. Y., Park, D. J., Kim, Y. H., Kim, Y., Choi, Y. W. and Lee, S. J. (2011)** 'Schisandra chinensis  $\alpha$ -iso-cubebenol induces heme oxygenase-1 expression through PI3K/Akt and Nrf2 signaling and has anti-inflammatory activity in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated macrophages', *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V., 11(11), pp. 1907–1915.

**Pashley, D. H. (1976)** 'A mechanistic analysis of gingival fluid production.', *Journal of periodontal research*, 11(2), pp. 121–34.

**Payne, J. B., Zachs, N. R., Reinhardt, R. A., Nummikoski, P. V and Patil, K. (1997)** 'The association between estrogen status and alveolar bone density changes in postmenopausal women with a history of periodontitis.', *The Journal of periodontology*, 68(1), pp. 24–31. doi: 10.1902/jop.1997.68.1.24.

**Perri, R., Nares, S., Zhang, S., Barros, S. P. and Offenbacher, S. (2012)** 'MicroRNA Modulation in Obesity and Periodontitis', *Journal of Dental Research*. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 91(1), pp. 33–38.

**Perrin, A. J., Jiang, X., Birmingham, C. L., So, N. S. Y. and Brumell, J. H. (2004)** 'Recognition of bacteria in the cytosol of mammalian cells by the ubiquitin system'. *Curr Biol*. 2004 May 4; 14(9):806-11.

**Petersen, P. E. and Ogawa, H. (2012)** 'The global burden of periodontal disease: Towards integration with chronic disease prevention and control', *Periodontology 2000*. Blackwell Publishing Ltd, 60(1), pp. 15–39.

**Pihlstrom B.L. (2001)** Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontology 2000*, 25: pp. 37–58

**Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S. and Johnson, N. W. (2005)** 'Periodontal diseases', in *Lancet*, pp. 1809–1820.

**Planello, A. C., Singhania, R., Kron, K. J., Bailey, S. D., Roulois, D., Lupien, M., Line, S. R. P., de Souza, A. P. and De Carvalho, D. D. (2016)** 'Pre-neoplastic epigenetic disruption of transcriptional enhancers in chronic inflammation', *Oncotarget. Impact Journals*, 7(13), pp. 1–15.

**Pöllänen, M. T., Salonen, J. I. and Uitto, V.-J. (2003)** 'Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease', *Periodontology 2000*, 31(1), pp. 12–31.

**Ponpuak, M., Davis, A. S., Roberts, E. A., Delgado, M. A., Dinkins, C., Zhao, Z., Virgin, H. W., Kyei, G. B., Johansen, T., Vergne, I. and Deretic, V. (2010)** 'Delivery of Cytosolic Components by Autophagic Adaptor Protein p62 Endows Autophagosomes with Unique Antimicrobial Properties'. *Immunity*. 2010 Mar 26; 32(3):329-41.

**Prato, G. P. P. (1999)** 'Mucogingival Deformities', *Annals of Periodontology*, 4(1), pp. 98–100.

**Preshaw, P. M. (2013)** 'Oral contraceptives and the periodontium', *Periodontol 2000*, 61(1):125-59.

**Qi L. Zhang Y. (2014)** 'The microRNA 132 Regulates Fluid Shear Stress-Induced Differentiation in Periodontal Ligament Cells through mTOR Signaling Pathway'. *Cell Physiol Biochem*. 33:433-445.

**Radovic N, Nikolić Jakoba N, Petrovic N, Milosavljevic A, Brkovic B, Roganovic J (2018)**. MicroRNA-146a and microRNA-155 as novel crevicular fluid biomarkers for periodontitis in non-diabetic and type 2 diabetic patients. *Journal of Clinical Peirodontology*, 45:663-71.

**Rivadeneira F, Mäkitie O. (2016) Osteoporosis and Bone Mass Disorders: From Gene Pathways to Treatments. Trends Endocrinol Metab. 27(5):262-281.**

**Reinhardt, R. A., Payne, J. B., Maze, C. A., Patil, K. D., Gallagher, S. J. and Mattson, J. S. (1999) 'Osteopenia/Osteoporosis on Clinical Periodontitis in Postmenopausal Women', J Periodontol. pp. 823–828.**

**Roberts, W. E. and Chamberlain, J. G. (1978) 'Scanning electron microscopy of the cellular elements of rat periodontal ligament.', Archives of oral biology, 23(7), pp. 587–9.**

**Rohani, M. G., DiJulio, D. H., An, J. Y., Hacker, B. M., Dale, B. A. and Chung, W. O. (2010) 'PAR1- and PAR2-induced innate immune markers are negatively regulated by PI3K/Akt signaling pathway in oral keratinocytes.', BMC immunology. BioMed Central Ltd, 11(1), p. 53. doi: 10.1186/1471-2172-11-53.**

**Rowland, R. W. (1999) 'Necrotizing Ulcerative Gingivitis', Annals of Periodontology, 4(1), pp. 65–73.**

**Ruggiero S1, Cosgarea R, Potempa J, Potempa B, Eick S, Chiquet M (2013). 'Cleavage of extracellular matrix in periodontitis: gingipains differentially affect cell adhesion activities of fibronectin and tenascin-C. Biochim Biophys Acta. 1832(4):517-26.**

**Ruoslahti, E. and Reed, J. C. (1994) 'Anchorage dependence, integrins, and apoptosis', Cell, 77(4), pp. 477–478.**

**Sabharwal, S. S. and Schumacker, P. T. (2014) 'Mitochondrial ROS in cancer: Initiators, amplifiers or an Achilles' heel?', Nature Rev Cancer. 14:709–721.**

**Saito A, Horie M, Ejiri K, Aoki A, Katagiri S, Maekawa S, Shinta S, Sophannary K, Tsuneto Y, Yoko Y, Yuichi I and Mitsuhiro O (2017). MicroRNA profiling in gingival crevicular fluid of periodontitis-a pilot study. FEBS Open Bio, 7: 981-994.**

**Sandros, J., Karlsson, C., Lappin, D. F., Madianos, P. M., Kinane, D. F. and Papapanou, P. M. (2000) 'Cytokine responses of oral epithelial cells to Porphyromonas gingivalis infection', Journal of Dental Research, 79(10), pp. 1808–1814.**

**Sandros, J., Papapanou, P. N., Nannmark, U. and Dahlén, G. (1994) 'Porphyromonas gingivalis invades human pocket epithelium in vitro', Journal of Periodontal Research. 29, pp. 62-69.**

**Schroeder, H. E. and Listgarten, M. A. (1997) 'The gingival tissues: the architecture of periodontal protection', Periodontology 2000. Blackwell Publishing Ltd, 13(1), pp. 91–120.**

**Schroeder, H. E. and Listgarten, M. A. (2003) 'The Junctional Epithelium: From Strength to Defense', Journal of Dental Research. SAGE Publications, 82(3), pp. 158–161.**

**Schulz, S., Immel, U. D., Just, L., Schaller, H. G., Glaser, C. and Reichert, S. (2016)** 'Epigenetic characteristics in inflammatory candidate genes in aggressive periodontitis', *Human Immunology*, 77(1), pp. 71–75.

**Scully, C. and Laskaris, G. (1998)** 'Mucocutaneous disorders', *Periodontology 2000*. Blackwell Publishing Ltd, 18(1), pp. 81–94.

**Serhan, C. N. (2008)** 'Controlling the Resolution of Acute Inflammation: A New Genus of Dual Anti-Inflammatory and Proresolving Mediators', *Journal of Periodontology*. American Academy of Periodontology, 79(8s), pp. 1520–1526.

**Seymour, G. J. and Taylor, J. J. (2004)** 'Shouts and whispers: An introduction to immunoregulation in periodontal disease.', *Periodontology 2000*, 35(1), pp. 9–13.

**Shin, J. and Choi, Y. (2012)** 'The fate of *Treponema denticola* within human gingival epithelial cells', *Molecular Oral Microbiology*, 27(6), pp. 471–482.

**Sims, M. R., Sampson, W. J. and Fuss, J. M. (1988)** 'Glomeruli in the molar gingival microvascular bed of germ-free rats', *Journal of Periodontal Research*. Blackwell Publishing Ltd, 23(4), pp. 248–251.

**Slavkin, H. C., Bessem, C., Fincham, A. G., Bringas, P., Santos, V., Snead, M. L. and Zeichner-David, M. (1989)** 'Human and mouse cementum proteins immunologically related to enamel proteins', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 991(1), pp. 12–18.

**Socransky, S. S. and Haffagee, A. D. (2002)** 'Dental biofilms: difficult therapeutic targets', *Periodontology 2000*. Munksgaard International Publishers, 28(1), pp. 12–55.

**Socransky, S. S. and Haffajee, A. D. (2005)** 'Periodontal microbial ecology', *Periodontology 2000*. Munksgaard International Publishers, 38(1), pp. 135–187.

**Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. and Kent, R. L. (1998)** 'Microbial complexes in subgingival plaque.', *Journal of clinical periodontology*, 25(2), pp. 134–44.

**Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, C. and Dibart, S. (1991)** 'Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site.', *Journal of clinical periodontology*, 18(10), pp. 766–75.

**Sodek, J. and McKee, M. D. (2000)** 'Molecular and cellular biology of alveolar bone.', *Periodontology 2000*, 24, pp. 99–126.

**Soma, T., Kaganoi, J., Kawabe, A., Kondo, K., Imamura, M. and Shimada, Y. (2006)** 'Nicotine induces the fragile histidine triad methylation in human esophageal squamous epithelial cells', *International Journal of Cancer*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 119(5), pp. 1023–1027.

## Referencias bibliográficas

- Song, G. G., Kim, J.-H. and Lee, Y. H. (2013)** 'Toll-like receptor (TLR) and matrix metalloproteinase (MMP) polymorphisms and periodontitis susceptibility: a meta-analysis', *Molecular Biology Reports*, 40(8), pp. 5129–5141.
- Song, Z. C., Zhou, W., Shu, R. and Ni, J. (2012)** 'Hypoxia induces apoptosis and autophagic cell death in human periodontal ligament cells through HIF-1 $\alpha$  pathway', *Cell Proliferation*, 45(3), pp. 239–248.
- Sousa, L. H., Linhares, E. V. M., Alexandre, J. T., Lisboa, M. R., Furlaneto, F., Freitas, R., Ribeiro, I., Val, D., Marques, M., Chaves, H. V., Martins, C., Brito, G. A. C. and Goes, P. (2016)** 'Effects of Atorvastatin on Periodontitis of Rats Subjected to Glucocorticoid-Induced Osteoporosis', *Journal of Periodontology*, 87(10), pp. 1206–1216. doi: 10.1902/jop.2016.160075.
- Stafford, P., Higham, J., Pinnock, A., Murdoch, C., Douglas, C. W. I., Stafford, G. P. and Lambert, D. W. (2013)** 'Gingipain-dependent degradation of mammalian target of rapamycin pathway proteins by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* during invasion', *Molecular Oral Microbiology*, 28(5), pp. 366–378.
- Stathopoulou, P. G., Galicia, J. C., Benakanakere, M. R., Garcia, C. A., Potempa, J. and Kinane, D. F. (2009)** 'Porphyromonas gingivalis induce apoptosis in human gingival epithelial cells through a gingipain-dependent mechanism', *BMC Microbiol* 2009;9:107.
- Stefani, F. A., Viana, M. B., Dupim, A. C., Brito, J. A. R., Gomez, R. S., Da Costa, J. E. and Moreira, P. R. (2013)** 'Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues', *Immunobiology*, 218(7), pp. 1012–1017.
- Stenvinkel, P., Karimi, M., Johansson, S., Axelsson, J., Suliman, M., Lindholm, B., Heimbürger, O., Barany, P., Alvestrand, A., Nordfors, L., Qureshi, A. R., Ekström, T. J. and Schalling, M. (2007)** 'Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation ? a novel risk factor for cardiovascular disease?', *Journal of Internal Medicine*. Blackwell Publishing Ltd, 261(5), pp. 488–499.
- Stewart, P. S., McFeters, G. A. and Xu, K. D. (2000)** 'Biofilm resistance to antimicrobial agents', *Microbiology*. Microbiology Society, 146(3), pp. 547–549.
- Stoecklin-Wasmer, C., Guarnieri, P., Celenti, R., Demmer, R. T., Kepschull, M. and Papapanou, P. N. (2012)** 'MicroRNAs and Their Target Genes in Gingival Tissues', *Journal of Dental Research*. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 91(10), pp. 934–940.
- Stoller, N. H., Karras, D. C. and Johnson, L. R. (1990)** 'Reliability of Crevicular Fluid Measurements Taken in the Presence of Supragingival Plaque', *Journal of Periodontology*, 61(11), pp. 670–673.
- Storz, G. (2002)** 'An expanding universe of noncoding RNAs.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 296(5571), pp. 1260–3.
- Suomi, S. Taipaleenmäki H, Seppänen A, Ripatti T, Väänänen K, Hentunen T, Säämänen AM, Laitala-Leinonen T(2008)**. MicroRNAs Regulate Osteogenesis and Chondrogenesis of Mouse Bone Marrow Stromal Cells. 22(2), pp.177–191.



**Sumazin, P., Yang, X., Chiu, H.-S., Chung, W.-J., Iyer, A., Llobet-Navas, D., Rajbhandari, P., Bansal, M., Guarnieri, P., Silva, J. and Califano, A. (2011)** 'An extensive microRNA-mediated network of RNA-RNA interactions regulates established oncogenic pathways in glioblastoma.', *Cell*. NIH Public Access, 147(2), pp. 370–81.

**Surarit, R., Krishnamra, N. and Seriwatanachai, D. (2016)** 'Prolactin receptor and osteogenic induction of prolactin in human periodontal ligament fibroblasts', *Cell Biology International*, 40(4), pp. 419–427.

**Suri, V. and Suri, V. (2014)** 'Menopause and oral health', *Journal of Mid-life Health*, 5(3), p. 115.

**Takedachi, M., Iyama, M., Sawada, K., Mori, K., Yamamoto, S., Morimoto, C., Yanagita, M. and Murakami, S. (2017)** 'Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  inhibits interleukin-6 and -8 production in gingival epithelial cells during hypoxia', *Journal of Periodontal Research*, 52(1), pp. 127–134.

**Tanabe, N., Maeno, M., Suzuki, N., Fujisaki, K., Tanaka, H., Ogiso, B. and Ito, K. (2005)** 'IL-1 $\alpha$  stimulates the formation of osteoclast-like cells by increasing M-CSF and PGE2 production and decreasing OPG production by osteoblasts', *Life Sciences*, 77(6), pp. 615–626.

**Taylor, J. J., Preshaw, P. M. and Donaldson, P. T. (2004)** 'Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease', *Periodontology 2000*. Munksgaard International Publishers, 35(1), pp. 158–182.

**Ten Cate, A. R. and Deporter, D. A. (1975)** 'The degradative role of the fibroblast in the remodelling and turnover of collagen in soft connective tissue', *The Anatomical Record*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 182(1), pp. 1–13.

**Thomson, D. W., Bracken, C. P. and Goodall, G. J. (2011)** 'Experimental strategies for microRNA target identification.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 39(16), pp. 6845–53.

**Ting, A. H., McGarvey, K. M. and Baylin, S. B. (2006)** 'The cancer epigenome--components and functional correlates.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 20(23), pp. 3215–31.

**Tonetti, M. S., Greenwell, H. and Kornman, K. S. (2018)** 'Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition', *Journal of Periodontology*. Wiley-Blackwell, 89, pp. S159–S172.

**Tonetti, M. S., Imboden, M. A. and Lang, N. P. (1998)** 'Neutrophil Migration Into the Gingival Sulcus Is Associated With Transepithelial Gradients of Interleukin-8 and ICAM-1', *Journal of Periodontology*, 69(10), pp. 1139–1147.

## Referencias bibliográficas

**Trombelli, L., Farina, R., Silva, C. O. and Tatakis, D. N. (2018)** 'Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations', *Journal of Periodontology*. Wiley-Blackwell, 89, pp. S46–S73.

**Tsuchida, S., Satoh, M., Takiwaki, M. and Nomura, F. (2017)** 'Ubiquitination in periodontal disease: A review', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), pp. 1–15.

**Uitto, V.-J. (2003)** 'Gingival crevice fluid - an introduction', *Periodontology 2000*, 31(1), pp. 9–11.

**Uitto, V.-J., Overall, C. M. and McCulloch, C. (2003)** 'Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid', *Periodontology 2000*, 31(1), pp. 77–104.

**Vaes, G. (1988)** 'Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts.', *Clinical orthopaedics and related research*, (231), pp. 239–71.

**Vieira Colombo, A., Silva, C. M., Haffajee, A. and Vieira Colombo, A. P. (2006)** 'Identification of oral bacteria associated with crevicular epithelial cells from chronic periodontitis lesions', *Journal of Medical Microbiology*, 55(5), pp. 609–615.

**Viana MB, Cardoso FP, Diniz MG, Costa FO, da Costa JE, Gomez RS, Moreira PR (2011).** Methylation pattern of IFN- $\gamma$  and IL-10 genes in periodontal tissues. *Immunobiology*, 216: 936-41.

**Van Dyke, T. E. (2008)** 'The Management of Inflammation in Periodontal Disease', *Journal of Periodontology*. American Academy of Periodontology, 79(8s), pp. 1601–1608.

**Vardar, S., Baylas, H. and Huseyinov, A. (2003)** 'Effects of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition on Gingival Tissue Levels of Prostaglandin E 2 and Prostaglandin F 2 $\alpha$  and Clinical Parameters of Chronic Periodontitis', *Journal of Periodontology*. American Academy of Periodontology 737 N. Michigan Avenue, Suite 800 Chicago, IL 60611-2690 USA , 74(1), pp. 57–63.

**Varkonyi-Gasic, E. Wu R., Wood M., Walton EF., Hellens RP (2007).** Protocol: A highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3(1): 12.

**Venugopal P, Koshy T, Lavu V, Rao SR, Ramasamy S, Hariharan S (2018).** Differential expression of microRNAs let-7a, miR-125b, miR-100, and miR-21 and interaction with NF- $\kappa$ B pathway genes in periodontitis pathogenesis. *Journal Cellular Physiology*, 233:5877-84.

**Viana, M. B., Cardoso, F. P., Diniz, M. G., Costa, F. O., da Costa, J. E., Gomez, R. S. and Moreira, P. R. (2011)** 'Methylation pattern of IFN- $\gamma$  and IL-10 genes in periodontal tissues.', *Immunobiology*, 216(8), pp. 936–41.

**Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C. C. and Croce, C. M. (2006)** 'A microRNA expression signature of

234

human solid tumors defines cancer gene targets.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 103(7), pp. 2257–61.

**Waller, T., Kesper, L., Hirschfeld, J., Dommisch, H., Kölpin, J., Oldenburg, J., Uebele, J., Hoerauf, A., Deschner, J., Jepsen, S. and Bekeredjian-Ding, I. (2016)** ‘Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles induce selective tumor necrosis factor tolerance in a Toll-like receptor 4- and mTOR-dependent manner’, *Infection and Immunity*, 84(4), pp. 1194–1204.

**Wang, L., Wu, F., Song, Y., Li, X., Wu, Q., Duan, Y. and Jin, Z. (2016)** ‘Long noncoding RNA related to periodontitis interacts with miR-182 to upregulate osteogenic differentiation in periodontal mesenchymal stem cells of periodontitis patients’, *Cell death & disease*, 7(8), p. e2327.

**Wang, X., Sun, H., Liao, H., Wang, C., Jiang, C., Zhang, Y. and Cao, Z. (2017)** ‘MicroRNA-155-3p Mediates TNF- $\alpha$ -Inhibited Cementoblast Differentiation’, *Journal of Dental Research*, 96(12), pp. 1430–1437.

**Wang, Y. L., He, H., Liu, Z. J., Cao, Z. G., Wang, X. Y., Yang, K., Fang, Y., Han, M., Zhang, C. and Huo, F. Y. (2015)** ‘Effects of TNF- $\alpha$  on Cementoblast Differentiation, Mineralization, and Apoptosis’, *Journal of Dental Research*, 94(9), pp. 1225–1232.

**Wang, Y. J., He, L., Yuan, M., Tsang, W. W. N., Hao, L., Wang, M., Chow, L. W. C., Cheung, M. N. B., Liu, Q., Ng, E. L. Y., Loo, W. T. Y., Chow, C. Y. C., Bai, L. J. and Yang, Z. (2014)** ‘Epigenetic changes of TIMP-3, GSTP-1 and 14-3-3 sigma genes as indication of status of chronic inflammation and cancer’, *International Journal of Biological Markers*, 29(3), pp. e208–e214.

**Wartz, I. E., O’Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D. L., Ma, A., Koonin, E. V. and Dixit, V. M. (2004)** ‘De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- $\kappa$ B signalling’. *Nature* 2004, 430, 694–699.

**Watson J. D., Baker, T. A., Stephen, P. B., Gann A., Levine M., Losick R. (2016).** *Biología molecular del gen 7<sup>a</sup>*. Madrid: Ed. Panamericana.

**Williams, R. C. (1990)** ‘Periodontal disease.’, *The New England journal of medicine*. Massachusetts Medical Society, 322(6), pp. 373–82.

**Wells, G., B. Shea, D. O’Connell, J. Robertson, J. Peterson, V. Welch, M. Losos, P. Tugwell (2017)** *The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of non-randomized studies in meta-analyses (2017)*.  
[http://www.ohri.ca/programs/clinical\\_epidemiology/oxford.asp](http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp).

**Wen, Y., Ji, Y., Zhang, Y., Jiang, B., Tang, C., Wang, Q., Xu, X. (2017).** Knockdown of yes-associated protein induces the apoptosis while inhibits the proliferation of human

periodontal ligament stem cells through crosstalk between Erk and Bcl-2 signaling pathways. *International Journal of Medical Sciences*, 14(12), 1231–1240.

**Worapamorn, W., Li, H., Pujic, Z., Xiao, Y., Young, W. G. and Bartold, P. M. (2000)** 'Expression and distribution of cell-surface proteoglycans in the normal Lewis rat molar periodontium', *Journal of Periodontal Research*. Munksgaard International Publishers, 35(4), pp. 214–224.

**Wu, L., Guo, Q., Yang, J. and Ni, B. (2017)** 'Tumor Necrosis Factor Alpha Promotes Osteoclast Formation Via PI3K/Akt Pathway-Mediated Blimp1 Expression Upregulation.', *Journal of cellular biochemistry*, 118(6), pp. 1308–1315.

**Xi JC, Zang HY, Guo LX, Xue HB, Liu XD, Bai YB, Ma YZ. (2015)** 'The PI3K/AKT cell signaling pathway is involved in regulation of osteoporosis'. *J Recept Signal Transduct Res*. 35(6):640-5.

**Xiang, L., Zhang, X., Yu, H., Wang, B., Lin, Z. and Gong, P. (2019)** 'Overexpression of  $\alpha$ CGRP promotes osteogenesis of periodontal ligament cells by regulation of YAP signaling.', *Journal of cellular physiology*, 234(4), pp. 5077–85.

**Xie, Y., Shu, R., Jiang, S., Liu, D. and Zhang, X. (2011)** 'Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues', *International Journal of Oral Science*. Nature Publishing Group, 3(3), pp. 125–134.

**Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C. T., Semeraro, F., Taylor, F. B., Esmon, N. L., Lupu, F. and Esmon, C. T. (2009)** 'Extracellular histones are major mediators of death in sepsis.', *Nature medicine*. NIH Public Access, 15(11), pp. 1318–21.

**Xu, X. C., Chen, H., Zhang, X., Zhai, Z. J., Liu, X. Q., Zheng, X. Y., Zhang, J., Qin, A. and Lu, E. Y. (2015)** 'Effects of oestrogen deficiency on the alveolar bone of rats with experimental Periodontitis', *Molecular Medicine Reports*, 12(3), pp. 3494–3502.

**Yamamoto, T., Domon, T., Takahashi, S., Arambawatta, A. K. S. and Wakita, M. (2004)** 'Immunolocation of proteoglycans and bone-related noncollagenous glycoproteins in developing acellular cementum of rat molars.', *Cell and tissue research*, 317(3), pp. 299–312.

**Yang, W., Han, W., Qin, A., Wang, Z., Xu, J. and Qian, Y. (2018)** 'The emerging role of Hippo signaling pathway in regulating osteoclast formation', *Journal of Cellular Physiology*, 233(6), pp. 4606–17.

**Yen, C. A., Damoulis, P. D., Stark, P. C., Hibberd, P. L., Singh, M. and Papas, A. S. (2008)** 'The Effect of a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor (Celecoxib) on Chronic Periodontitis', *Journal of Periodontology*, 79(1), pp. 104–113.

**Yoneda T, Tomofuji T, Ekuni D, Azuma T, Maruyama T, Fujimori K (2019)**. Serum microRNAs and chronic periodontitis: A case- control study. *Archives of Oral Biology*, 101: 57-63.

**Yoshimoto, T., Fujita, T., Kajiya, M., Ouhara, K., Matsuda, S., Komatsuzawa, H. and Shiba, H. (2016).** Aggregatibacter actinomycetemcomitans outer membrane protein 29 ( Omp29 ) induces TGF-  $\beta$  -regulated apoptosis signal in human gingival epithelial cells via fibronectin / integrin  $\beta$  1 / FAK cascade. *Cell Microbiol.* 18(12):1723-1738.

**Yoshizawa, T., Takizawa, F., Iizawa, F., Ishibashi, O., Kawashima, H., Matsuda, A., Endo, N. and Kawashima, H. (2004)** 'Homeobox protein MSX2 acts as a molecular defense mechanism for preventing ossification in ligament fibroblasts.', *Molecular and cellular biology.* American Society for Microbiology (ASM), 24(8), pp. 3460–72.

**Yu BP (1996).** Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med* 21:651-668.

**Yu, H., Sun, C. and Argraves, K. M. (2016)** 'Periodontal inflammation and alveolar bone loss induced by Aggregatibacter actinomycetemcomitans is attenuated in sphingosine kinase 1-deficient mice', *Journal of Periodontal Research*, 51(1), pp. 38–49.

**Yu, X. J., Xiao, C. J., Du, Y. M., Liu, S., Du, Y. and Li, S. (2015)** 'Effect of hypoxia on the expression of RANKL/OPG in human periodontal ligament cells in vitro', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(10), pp.12929–12935.

**Zander, H. A. and Hurzeler, B. (1958)** 'Continuous Cementum Apposition', *Journal of Dental Research.* SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 37(6), pp. 1035–1044.

**Zeerleder, S., Zwart, B., Wuillemin, W. A., Aarden, L. A., Johan Groeneveld, A. B., Caliezi, C., M van Nieuwenhuijze, A. E., van Mierlo, G. J., M Eerenberg, A. J., Lämmle, B. and Erik Hack, C. (2003)** 'Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis. *Critical Care Medicine*, 31 (7): 1947-51.

**Zeng, X.-T., Liu, D.-Y., Kwong, J. S. W., Leng, W.-D., Xia, L.-Y. and Mao, M. (2015)** 'Meta-Analysis of Association Between Interleukin-1 $\gamma$  C-511T Polymorphism and Chronic Periodontitis Susceptibility', *Journal of Periodontology.* American Academy of Periodontology, 86(6): 812–819.

**Zhang, F., Engebretson, S. P., Morton, R. S., Cavanaugh, P. F., Subbaramaiah, K. and Dannenberg, A. J. (2003)** 'The overexpression of cyclo-oxygenase-2 in chronic periodontitis', *Journal of the American Dental Association.* 134: 861–867.

**Zhang, F., Qiu, Q., Song, X., Chen, Y., Wu, J. and Liang, M. (2017)** 'Signal-Regulated Protein Kinases/Protein Kinase B-p53-BH3-Interacting Domain Death Agonist Pathway Regulates Gingipain-Induced Apoptosis in Osteoblasts', *Journal of Periodontology*, 88(11), pp. e200–e210.

**Zhang, S., Barros, S. P., Moretti, A. J., Yu, N., Zhou, J., Preisser, J. S., Niculescu, M. D. and Offenbacher, S. (2013)** 'Epigenetic regulation of TNFA expression in periodontal disease.', *Journal of periodontology.* American Academy of Periodontology, 84(11), pp. 1606–16.

## Referencias bibliográficas

Zhang, S., Barros, S. P., Niculescu, M. D., Moretti, A. J., Preisser, J. S. and Offenbacher, S. (2010) 'Alteration of PTGS2 promoter methylation in chronic periodontitis.', *Journal of dental research*. SAGE Publications, 89(2), pp. 133–7.

Zhang, S., Crivello, A., Offenbacher, S., Moretti, A., Paquette, D. W. and Barros, S. P. (2010) 'Interferon-gamma promoter hypomethylation and increased expression in chronic periodontitis', *Journal of Clinical Periodontology*. Blackwell Publishing Ltd, 37(11), pp. 953–961.

Zhang, X., Schuppan, D., Becker, J., Reichart, P. and Gelderblom, H. R. (1993) 'Distribution of undulin, tenascin, and fibronectin in the human periodontal ligament and cementum: comparative immunoelectron microscopy with ultra-thin cryosections.', *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 41(2), pp. 245–51.

Zhang, Z. Kang Y, Zhang Z, Zhang H, Duan X, Liu J, Li X, Liao W. (2012). Expression of microRNAs during chondrogenesis of human adipose-derived stem cells. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(12), pp.1638–1646.

Zhong, Y., Slade, G. D., Beck, J. D. and Offenbacher, S. (2007) 'Gingival crevicular fluid interleukin-1?, prostaglandin E 2 and periodontal status in a community population', *Journal of Clinical Periodontology*. Blackwell Publishing Ltd, 34(4), pp. 285–293.

Zhu, L. Xu H, Lv W, He Z, Ye P, Wang Y, Hu J (2018). miR-199b-5p Regulates Immune-Mediated Allograft Rejection after Lung Transplantation Through the GSK3 $\beta$  and NF- $\kappa$ B Pathways. *Inflammation*, 41(4), pp.1524–1535.

# ANEXOS





## Anexo 1. Comité de Ética.

VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA Vicerectorat  
d'Investigació i Política Científica

**D. José María Montiel Company**, Profesor Contratado Doctor Interino del departamento de Estomatología, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

**CERTIFICA:**

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada el día 7 de noviembre de 2016, una vez estudiado el proyecto de investigación titulado:

*“Escreening de biomarcadores epigenéticos en el surco gingival: marcadores de la regulación ósea y diferenciación celular a partir de células madre implicadas en la regeneración ósea”, número de procedimiento H1477063568528,*

cuy responsable es D. Pedro J. Almiñana Pastor, ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a quince de noviembre de dos mil dieciséis.



## Anexo 2. Consentimiento informado.

### IMPRESO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS SUJETOS A INCLUIR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACION

**TÍTULO:** **Detección y Screening de Marcadores epigenéticos en el fluido gingival.**

**Investigador responsable:** Pedro José Almiñana Pastor

#### OBJETIVOS:

Este estudio se realiza con el fin de detectar y analizar distintos marcadores epigenéticos que pueden encontrarse en el fluido que se segrega en el surco que aparece entre la encía y el diente (Fluido Crevicular).

Los investigadores pensamos que los niveles de estos marcadores pueden ser de gran ayuda en el diagnóstico y monitorización de respuesta del tratamiento de la enfermedad periodontal.

#### DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

En la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, estamos realizando una investigación para analizar los niveles de los marcadores del metabolismo óseo, RANKL/OPG, durante los primeros estadios de curación tras la colocación de implantes dentales.

La epigenética ha supuesto un gran impacto en la investigación biomédica y está proporcionando nuevos biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de enfermedades. Además, la epigenética también está contribuyendo a señalar los distintos procesos moleculares que ocurren en la enfermedad, en este sentido son de gran interés los marcadores epigenéticos implicados en la enfermedad periodontal.

Los miRNAs son biomoléculas muy prometedoras como biomarcadores porque actúan como moléculas de señalización y participan en muchos procesos biológicos como el desarrollo, diferenciación y apoptosis celular. Además se ha demostrado su valor como marcadores biológicos dinámicos en una amplia variedad de enfermedades humanas.

Su Participación en este estudio es muy sencilla. Tras la valoración habitual y según procedimientos contrastados se tomarán unas muestras del fluido gingival del surco de su encía, de donde se analizarán y medirán los valores de distintos marcadores moleculares epigenéticos.

La exploración se realizará en la clínica del Máster de Periodoncia de la Universitat de València.

El procedimiento para la exploración será el siguiente: se colocarán unas tiras de papel absorbente estéril en el surco gingival para tomar una muestra del fluido para el análisis. Este procedimiento es totalmente indoloro.

Si usted está de acuerdo en participar, libremente firme el consentimiento informado que se encuentra al final de este impreso.

#### RIESGOS Y BENEFICIOS

-No existen riesgos asociados a este estudio.

-Usted se beneficiará de esta exploración ya que se le comunicará el estado de salud de sus encías.

-Desde el punto de vista de la investigación, obtendremos una valiosa información sobre nuevos métodos diagnósticos en la patología periodontal.

#### PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria y no recibirá remuneración alguna.

Como paciente, el rechazo a participar no supondrá ninguna penalización ni afectará en modo alguno a la calidad de la asistencia sanitaria que reciba en la clínica universitaria.

#### PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD

Sus datos personales y de salud serán incorporados a un fichero de datos para su tratamiento, de acuerdo con lo estipulado en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de datos de Carácter Personal, de 13 de Diciembre (LOPD).

Toda la información obtenida será confidencial, los datos recogidos se introducirán, por el Equipo Investigador, en una base de datos para realizar el análisis estadístico pero su nombre no aparecerá en ningún documento del estudio, sólo se le asignará un número. En ningún caso se le identificará en las publicaciones que puedan realizarse con los resultados del estudio. Sin embargo, esta información podrá ser revisada por *el Comité Ético de Investigación en humanos de la Universitat de València*, así como por organismos gubernamentales competentes.

## Búsqueda de miARNs en FCG: expresión diferencial en sujetos con periodontitis crónica avanzada

El estudio se realizará asegurando el cumplimiento de normas éticas y legales vigentes (Declaración de Helsinki).

El titular de los datos personales podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, y de revocación del consentimiento en los términos previstos en la normativa aplicable.

Si tiene alguna duda o no entiende este texto consulte antes de firmar el documento con D. Pedro José Almiñana Pastor con Nº de teléfono 636608233 investigador responsable de este estudio. Finalmente, si está de acuerdo firme este consentimiento.

Se le entregará una copia.

### **Firmado:**

### **INVESTIGADOR RESPONSABLE:**

*D. PEDRO JOSE ALMIÑANA PASTOR. Tel: 636608233*

Periodoncia. Departamento de Estomatología. Facultad de Medicina y Odontología.  
UNIVERSIDAD DE VALENCIA

### **DIRECTORES DEL ESTUDIO :**

*Prof. Dr. D. Francisco Manuel Alpiste Illueca.*

PROF. DR. D. Jose Luis Garcia Gimenez

*PROF. DR. D. ANDRÉS LÓPEZ ROLDÁN*

Periodoncia. Departamento de Estomatología. Facultad de Medicina y Odontología.  
UNIVERSIDAD DE VALENCIA

### **EL PARTICIPANTE:**

Fdo.: D./Dña.....

En.....a.....de.....de 20.....

**DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE SUJETO DE ESTUDIO** (ejemplar para el paciente)

Título del proyecto de investigación:

**Detección y Screening de Marcadores epigenéticos en el fluido gingival.**

**D./Dña**.....**de**.....**años de edad, con domicilio en**  
.....**y DNI**.....

**DECLARO**

Que he hablado con *D. PEDRO JOSE ALMIÑANA PASTOR* para la explicación del estudio.

Que he leído la hoja de información anterior.

Que he podido hacer preguntas sobre el estudio.

Que he comprendido las explicaciones que se me han facilitado

Que he recibido suficiente información sobre el estudio.

Que comprendo que mi participación es voluntaria.

Que comprendo que puedo retirarme del estudio:

Cuando quiera.

Sin tener que dar explicaciones.

Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

**CONSIENTO**

Doy mi consentimiento para que este material aparezca en informes y artículos de revista de publicaciones médicas y/o odontológicas.

Entiendo que:

Mi nombre no será publicado.

El material no será utilizado para publicidad o embalaje.

El material no será utilizado fuera de contexto.

Fdo.: D./Dña.....

En.....a.....de.....de 20.....

**Declaración del profesional de Salud:**

He informado debidamente al paciente

Fdo.: *D. PEDRO JOSE ALMIÑANA PASTOR. DNI 20446398-L Col num: 46004140*

*Tel: 636608233*

Periodoncia. Departamento de Estomatología. Facultad de Medicina y Odontología.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

**DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE SUJETO DE ESTUDIO** (ejemplar para el equipo investigador)

**Título del proyecto de investigación:**

**Detección y Screening de Marcadores epigenéticos en el fluido gingival.**

**D./Dña.....de.....años de edad, con domicilio en  
.....y DNI.....**

**DECLARO**

- Que he hablado con *D. PEDRO JOSE ALMIÑANA PASTOR* para la explicación del estudio.
- Que he leído la hoja de información anterior.
- Que he podido hacer preguntas sobre el estudio.
- Que he comprendido las explicaciones que se me han facilitado
- Que he recibido suficiente información sobre el estudio.
- Que comprendo que mi participación es voluntaria.
- Que comprendo que puedo retirarme del estudio:
  - Cuando quiera.
  - Sin tener que dar explicaciones.
  - Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

**CONSIENTO**

- Doy mi consentimiento para que este material aparezca en informes y artículos de revista de publicaciones médicas y/o odontológicas.
- Entiendo que:
  - Mi nombre no será publicado.
  - El material no será utilizado para publicidad o embalaje.
  - El material no será utilizado fuera de contexto.

Fdo.: D./Dña.....

En.....a.....de.....de 20.....

**Declaración del profesional de Salud:**

He informado debidamente al paciente

Fdo.: *D. PEDRO JOSE ALMIÑANA PASTOR. DNI 20446398-L Col num: 46004140  
Tel: 636608233*

Periodoncia. Departamento de Estomatología. Facultad de Medicina y Odontología.  
UNIVERSIDAD DE VALENCIA

### Anexo 3. Tablas de relación de material clínico y de laboratorio.

Tabla de relación del material clínico empleado para el desarrollo del estudio	
Instrumental	Descripción
◦Sonda periodontal Williams ( PQ-OW 208 396: 10mm. Hu-Friedry ®,USA)	Sonda milimetrada con marcas cada milímetro hasta diez milímetros.
◦Sistema de paralelización radiográfica O-Ring (Densply®)	Sistema para la correcta paralelización del haz de rayos X. Presenta tres aros distintos para la toma de radiografías en anteriores, posteriores y aletas de mordida.
◦Sonda bifurcaciones Nabers (2N mango 7 Qulix 12 mm. Hu-Frieddy ®, USA)	Sonda con morfología angulada para el sondaje de furcaciones.
◦Pinzas de boca convencionales	Empleadas en este caso para la colocación del periopaper®.
◦Revelador de placa (GC® Tri Plaque ID Gel)	Este gel tiñe la placa dental, de modo que la placa antigua se tiñe de azul oscuro, la reciente de rojo y la placa con riesgo de caries de azul claro.
◦Aparato de radiografías intraoral (E-wood®, Haigol-Dong, Korea)	Se empleaba para la toma de radiografías de la serie radiográfica periapical, con tiempos de disparo de hasta 0,20 segundos.
◦Perio paper strips ®: tiras de papel especiales para recoger volúmenes de fluido crevicular de 0-1,2 µl (Oraflow®, New York, USA)	Presentan una parte anaranjada para poder ser sujetados con una pinza y una parte blanca o de papel de filtro para la toma de muestra.
◦Jeringa Hamilton (Hamilton® company, USA)	2 µl, con marcas cada 0,1 µl.
◦Periotron 8000® (Oraflow®, New York, USA)	Micro-medidor de humedad electrónico especialmente diseñado para valorar el fluido crevicular, el fluido de la bolsa periodontal y el fluido salival
◦Tubos mini-ependorf: Viales de reacción 1,5 ml (Ependorff®, Germany, Europe)	Para el almacenaje de la muestra de FCG en el congelador a -80°C. También empleados en alguno de los pasos de manipulación de muestra en el laboratorio.

Tabla de relación del material clínico empleado para el desarrollo del estudio	
Instrumental	Descripción
◦Cureta Gracey modi#1/2 mango #6 (Hu-Friedry ®, USA)	Empleadas para eliminar la placa supragingival sin crear inflamación en tejidos de los dientes del sector anterior.
◦Cureta Gracey modi#7/8 mango #6 (Hu-Friedry ®, USA)	Empleadas para eliminar la placa supragingival sin crear inflamación en tejidos de los dientes premolares y caras libres de molares.
◦Cureta Gracey modi#11/12 mango #6 (Hu-Friedry ®, USA)	Empleadas para eliminar la placa supragingival sin crear inflamación en tejidos de la superficie mesial.
◦ Cureta Gracey modi#13/14 mango #6 (Hu-Friedry ®, USA)	Empleadas para eliminar la placa supragingival sin crear inflamación en tejidos de la superficie distal.
◦Cureta Vision Curvette 1/2 mango #6 (Hu-Friedry ®, USA)	Empleadas para eliminar la placa supragingival sin crear inflamación en tejidos de zonas de difícil acceso.
◦Cureta Columbia #13/14 mango #6 (Hu-Friedry ®, USA)	Empleadas para eliminar la placa supragingival sin crear inflamación en tejidos.

Tabla relación de material de laboratorio utilizado en el estudio.	
Instrumental, Kits y reactivos	Descripción
Pipetas de precisión.	Pipetas calibradas de 10-1000 µl y puntas desechables (Ependorff®,Germany, Europe)
NanoDrop ND 2000® Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).	Espectrofotómetro de microvolúmenes para la cuantificación de ácidos nucleicos.
Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc. Santa Clara, CA, USA)	Sistema para la evaluación de la calidad del ARN y el % de microARNs contenidos en una muestra.

NextSeq 550 (Illumina, San Diego, CA, USA)	Sistema de secuenciación masiva que permite el análisis multiplex del genoma completo, el exoma, los microARNs, y el transcriptoma.
QuantiStudio 5 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).	Sistema de PCR cuantitativa en tiempo real que permite el análisis de la expresión de genes, microARNs y ARN no codificantes, genotipado de SNP, variación del número de copias, detección de mutaciones, enzimas del metabolismo de fármacos y expresión de proteínas.
Centrífuga	
TruSeq®. Kit de Construcción de librerías	Kit de construcción de las librerías para la secuenciación de smallRNAs
◉PBS (Fosfato buffer saline)	
◉ Suero Humano	Obtenido por centrifugación de una muestra sanguínea del investigador (PA) y empleado para la calibración del periotron 8000® como se especificará más adelante.
◉miRNAeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, CA. USA)	Kit de extracción de miRNAs de fluidos biológicos.
NEXTFLEX® Small RNA-Seq kit v3 for Illumina Platforms (Bioo Scientific® Corporation, Texas, USA)	Kit de construcción de las librerías para la secuenciación de smallRNAs
kit NSQ 500 High Output KT v2 (75 CYS) (Illumina, San Diego, CA, USA).	Es el kit de la serie NextSeq que proporciona todos los componentes necesarios para la secuenciación en la plataforma en formato de 3 cartuchos listos para usar (reactivo, celda de flujo y tampón).



## Anexo 4. Datos de laboratorio.

### Cuantificación de miARNs con Bioanalyzer

Tabla Anexo. Cuantificación de microARNs Bioanalyzer.				
		Chip Small		6 $\mu$ l
ID	Muestra	pg/ $\mu$ l	ng/ $\mu$ l	ng usados
1	P7	7627,1	7,63	45,76
2	P8	4558,6	4,56	27,35
3	P9	2144,9	2,14	12,87
4	P10	1023,3	1,02	6,14
5	P11	1460,3	1,46	8,76
6	P12	5779,3	5,78	34,68
7	P13	619,5	0,62	3,72
8	P14	1259,3	1,26	7,56
9	P15	2803,8	2,80	16,82
10	P16	4243,9	4,24	25,46
11	P17	2178,2	2,18	13,07
12	C1	401,2	0,40	2,41
13	C2	196,2	0,20	1,18
14	C3	412,3	0,41	2,47
15	C5	106,8	0,11	0,64
16	C6	775,1	0,78	4,65
17	C7	875,7	0,88	5,25
18	C8	625,8	0,63	3,75
19	C9	735	0,74	4,41
20	C10	312	0,31	1,87
21	C11	1557	1,56	9,34
22	C12	168,8	0,17	1,01
23	C13			0,00

# ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO

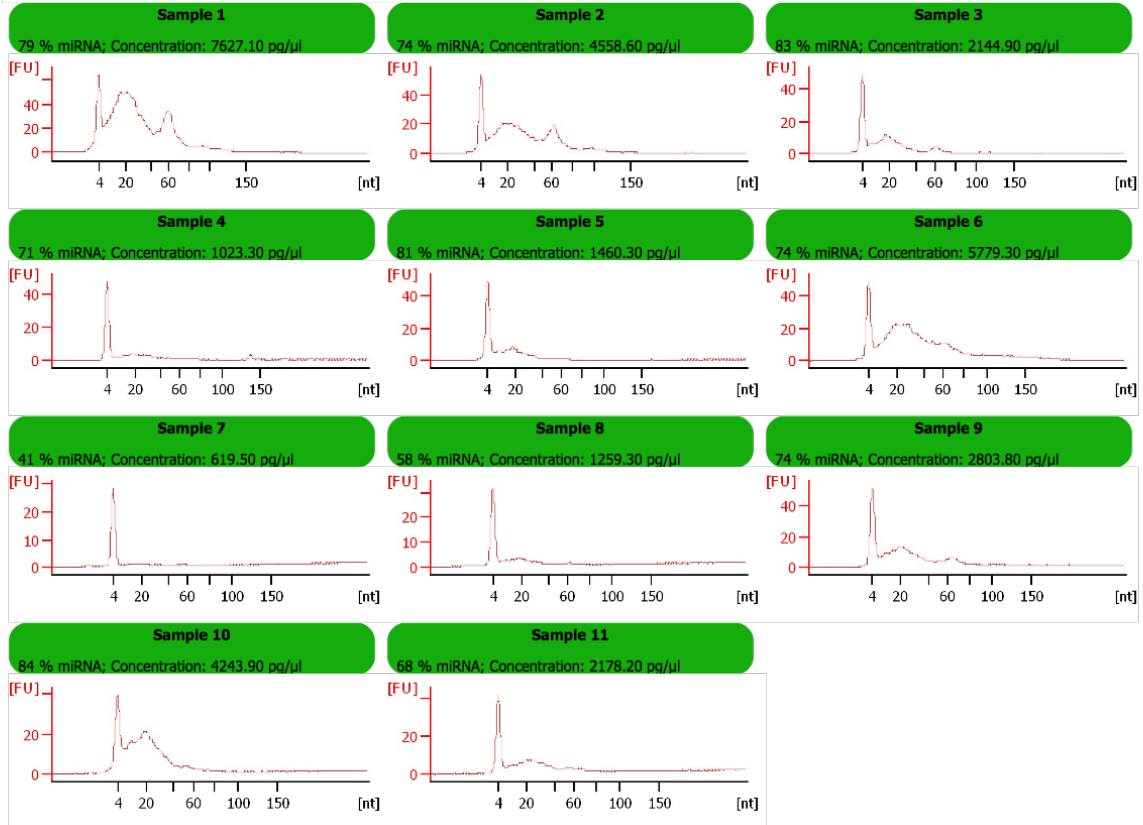
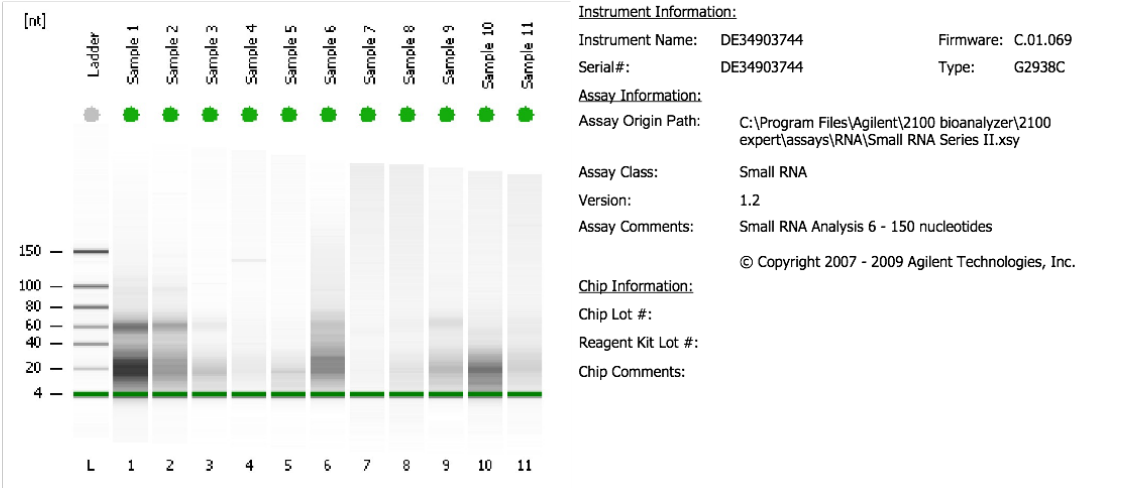
2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Page 1 of 15

Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Created: 31/05/2018 11:24:36  
 Modified: 31/05/2018 12:54:38

## Electrophoresis File Run Summary



Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad  
 Created: 31/05/2018 11:24:36  
 Modified: 31/05/2018 12:54:38

**Electrophoresis File Run Summary (Chip Summary)**

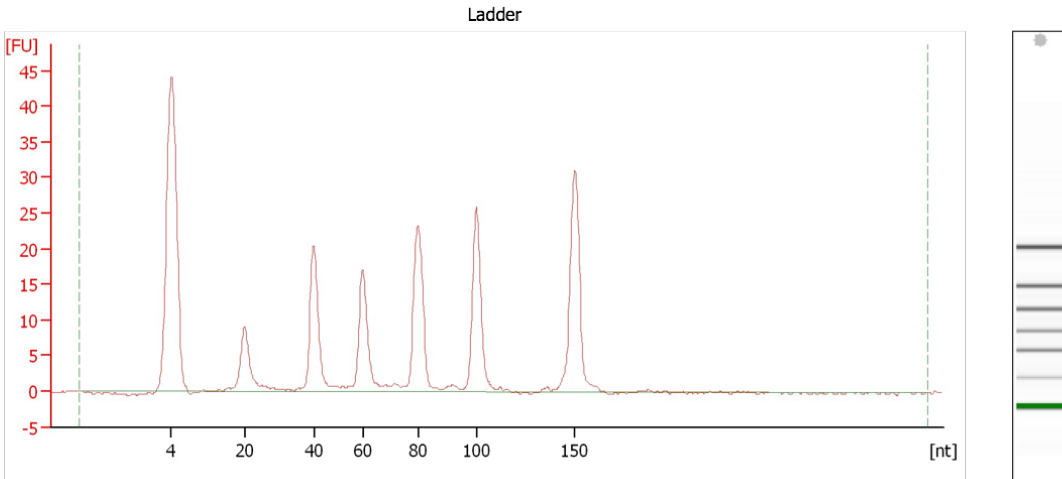
Sample Name	Sample Comment	Status	Result Label	Result Color
Sample 1		✓	79 % miRNA; Concentration: 7627.10 pg/μl	
Sample 2		✓	74 % miRNA; Concentration: 4558.60 pg/μl	
Sample 3		✓	83 % miRNA; Concentration: 2144.90 pg/μl	
Sample 4		✓	71 % miRNA; Concentration: 1023.30 pg/μl	
Sample 5		✓	81 % miRNA; Concentration: 1460.30 pg/μl	
Sample 6		✓	74 % miRNA; Concentration: 5779.30 pg/μl	
Sample 7		✓	41 % miRNA; Concentration: 619.50 pg/μl	
Sample 8		✓	58 % miRNA; Concentration: 1259.30 pg/μl	
Sample 9		✓	74 % miRNA; Concentration: 2803.80 pg/μl	
Sample 10		✓	84 % miRNA; Concentration: 4243.90 pg/μl	
Sample 11		✓	68 % miRNA; Concentration: 2178.20 pg/μl	
Ladder		✓	Number of Peaks: 6	
<b>Chip Lot #</b>			<b>Reagent Kit Lot #</b>	

**Chip Comments :**

Assay Class: Small RNA  
Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Created: 31/05/2018 11:24:36  
Modified: 31/05/2018 12:54:38

**Electropherogram Summary**



**Overall Results for Ladder**

Result Flagging Color:  Result Flagging Label: Number of Peaks: 6

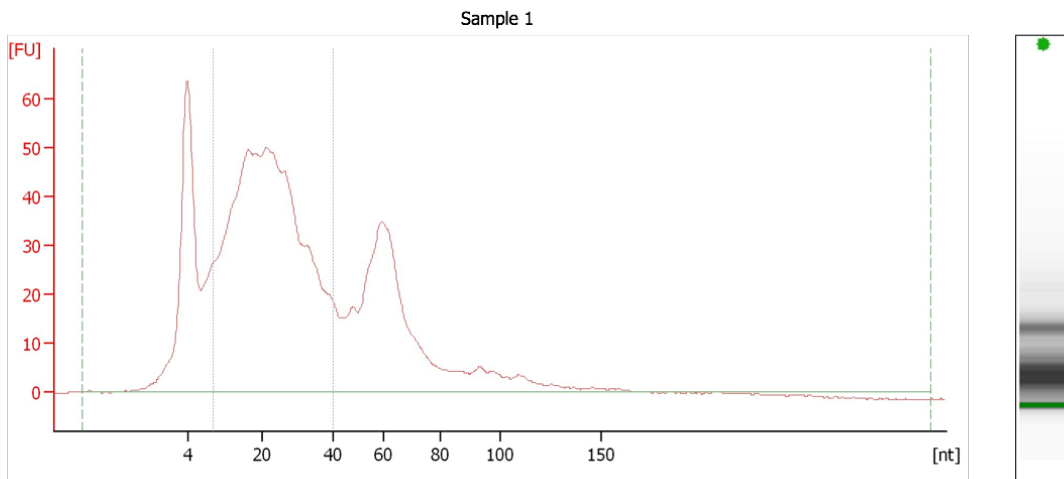
2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Page 4 of 15

Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Created: 31/05/2018 11:24:36  
 Modified: 31/05/2018 12:54:38

**Electropherogram Summary Continued ...**



**Overall Results for sample 1 : Sample 1**

Small RNA Concentration [pg/μl]: 9.705,9  
 miRNA Concentration [pg/μl]: 7.627,1  
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 79

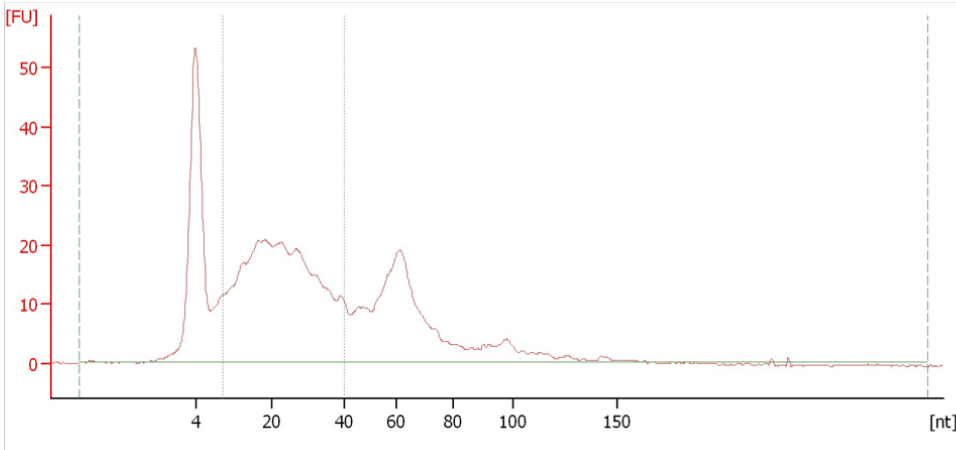
Result Flagging Color:             
 Result Flagging Label: 79 % miRNA;  
 Concentration: 7627.10 pg/μl

Assay Class: Small RNA  
Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Created: 31/05/2018 11:24:36  
Modified: 31/05/2018 12:54:38

**Electropherogram Summary Continued ...**

Sample 2



**Overall Results for sample 2 : Sample 2**

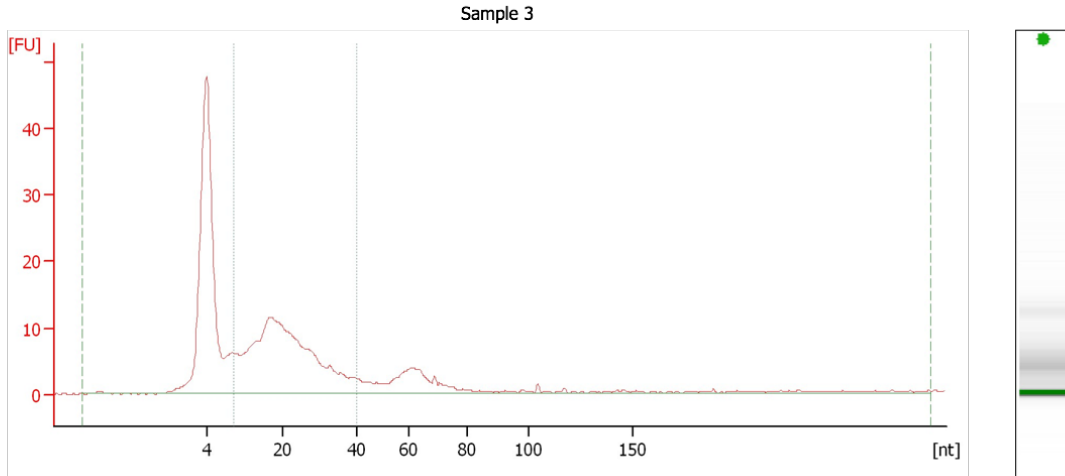
Small RNA Concentration [pg/ul]: 6.144,0  
miRNA Concentration [pg/ul]: 4.558,6  
miRNA / Small RNA Ratio [%]: 74

Result Flagging Color:             
Result Flagging Label: 74 % miRNA;  
Concentration: 4558.60 pg/ul

Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Created: 31/05/2018 11:24:36  
 Modified: 31/05/2018 12:54:38

**Electropherogram Summary Continued ...**



**Overall Results for sample 3 : Sample 3**

Small RNA Concentration [pg/μl]: 2.569,8  
 miRNA Concentration [pg/μl]: 2.144,9  
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 83

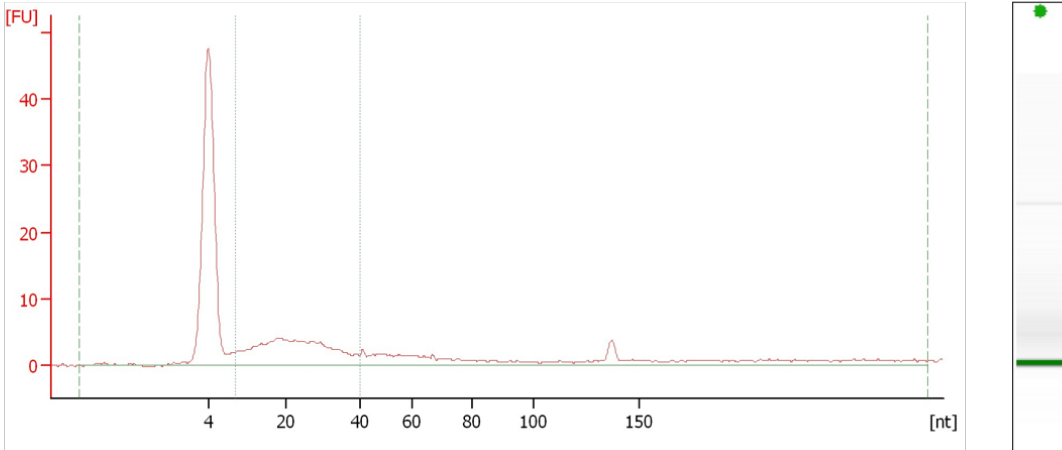
Result Flagging Color: ████████  
 Result Flagging Label: 83 % miRNA;  
 Concentration: 2144.90 pg/μl

Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Created: 31/05/2018 11:24:36  
 Modified: 31/05/2018 12:54:38

**Electropherogram Summary Continued ...**

Sample 4



**Overall Results for sample 4 : Sample 4**

Small RNA Concentration [pg/μl]: 1.431,6  
 miRNA Concentration [pg/μl]: 1.023,3  
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 71

Result Flagging Color: ████████  
 Result Flagging Label: 71 % miRNA;  
 Concentration: 1023.30 pg/μl



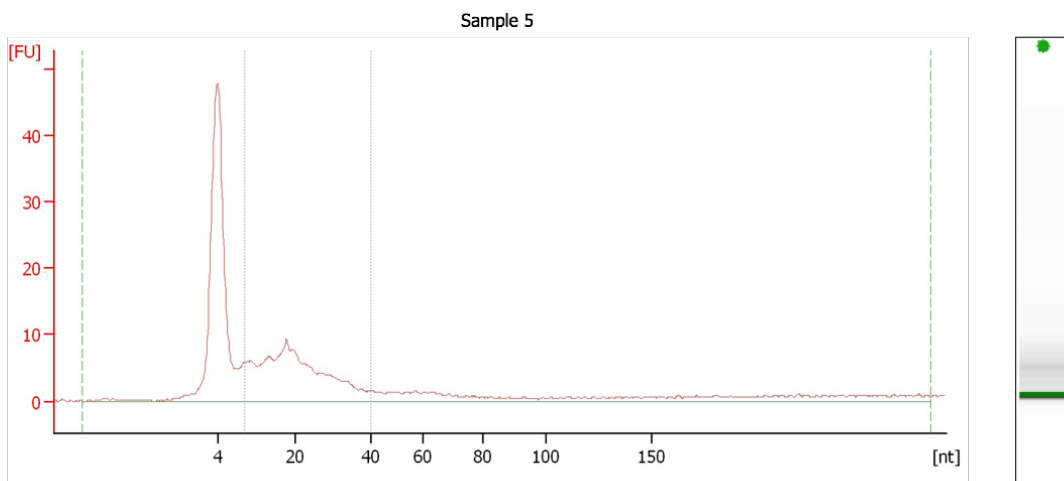
2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Page 8 of 15

Assay Class: Small RNA  
Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Created: 31/05/2018 11:24:36  
Modified: 31/05/2018 12:54:38

**Electropherogram Summary Continued ...**



**Overall Results for sample 5 : Sample 5**

Small RNA Concentration [pg/μl]: 1.800,8  
miRNA Concentration [pg/μl]: 1.460,3  
miRNA / Small RNA Ratio [%]: 81

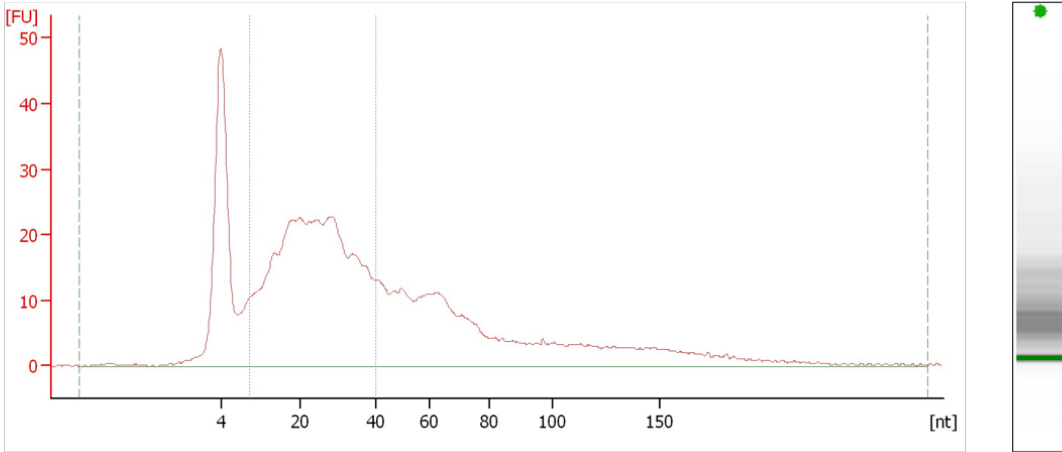
Result Flagging Color:             
Result Flagging Label: 81 % miRNA;  
Concentration: 1460.30 pg/μl

Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Created: 31/05/2018 11:24:36  
 Modified: 31/05/2018 12:54:38

**Electropherogram Summary Continued ...**

Sample 6



**Overall Results for sample 6 : Sample 6**

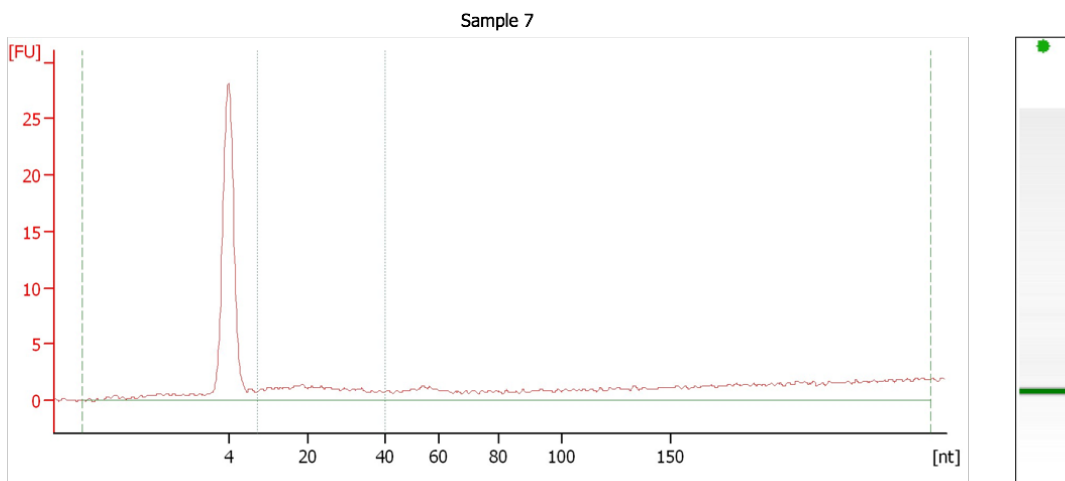
Small RNA Concentration [pg/μl]: 7.826,6  
 miRNA Concentration [pg/μl]: 5.779,3  
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 74

Result Flagging Color: ████████  
 Result Flagging Label: 74 % miRNA;  
 Concentration: 5779.30 pg/μl

Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Created: 31/05/2018 11:24:36  
 Modified: 31/05/2018 12:54:38

**Electropherogram Summary Continued ...**



**Overall Results for sample 7 : Sample 7**

Small RNA Concentration [pg/μl]: 1.511,4  
 miRNA Concentration [pg/μl]: 619,5  
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 41

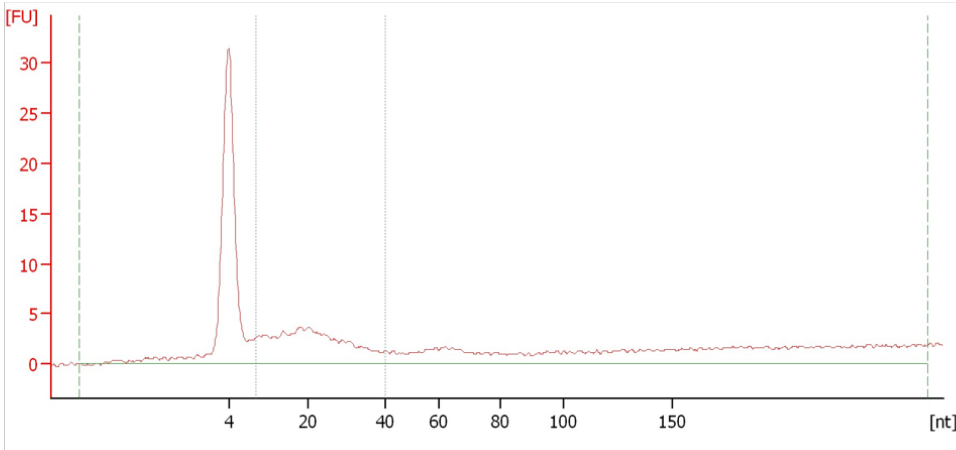
Result Flagging Color:             
 Result Flagging Label: 41 % miRNA;  
 Concentration: 619.50  
 pg/μl

Assay Class: Small RNA  
Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Created: 31/05/2018 11:24:36  
Modified: 31/05/2018 12:54:38

**Electropherogram Summary Continued ...**

Sample 8



**Overall Results for sample 8 : Sample 8**

Small RNA Concentration [pg/ul]: 2.153,9  
miRNA Concentration [pg/ul]: 1.259,3  
miRNA / Small RNA Ratio [%]: 58

Result Flagging Color:   
Result Flagging Label: 58 % miRNA;  
Concentration: 1259.30 pg/ul

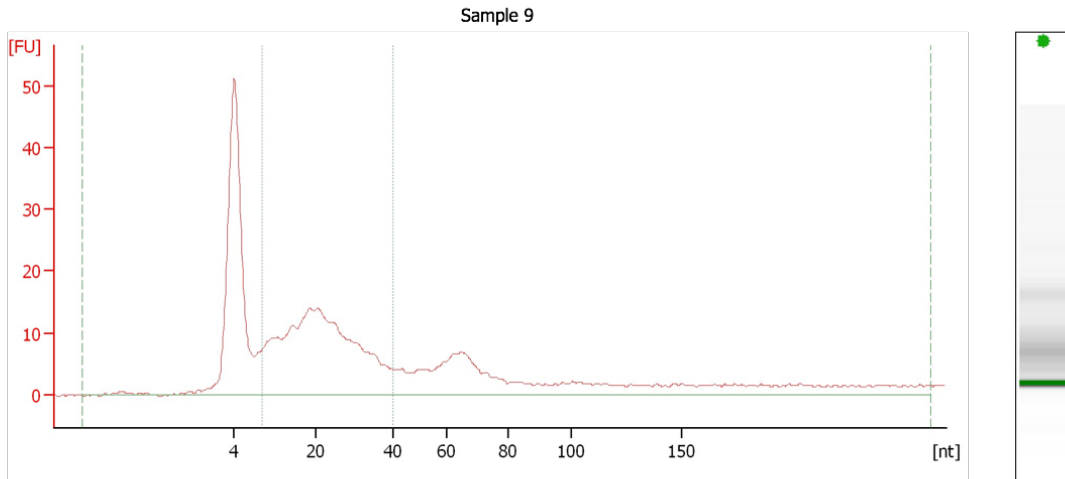
2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Page 12 of 15

Assay Class: Small RNA  
Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Created: 31/05/2018 11:24:36  
Modified: 31/05/2018 12:54:38

**Electropherogram Summary Continued ...**



**Overall Results for sample 9 : Sample 9**

Small RNA Concentration [pg/μl]: 3.807,6  
miRNA Concentration [pg/μl]: 2.803,8  
miRNA / Small RNA Ratio [%]: 74

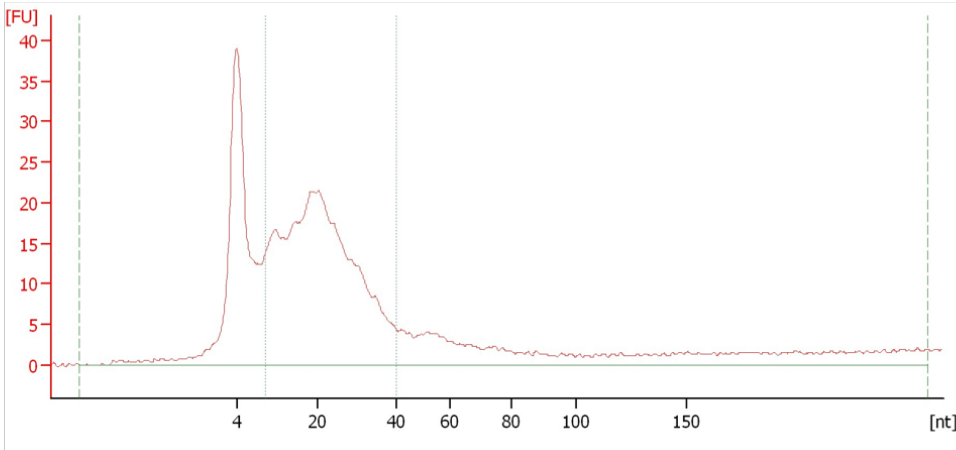
Result Flagging Color:             
Result Flagging Label: 74 % miRNA;  
Concentration: 2803.80 pg/μl

Assay Class: Small RNA  
Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Created: 31/05/2018 11:24:36  
Modified: 31/05/2018 12:54:38

**Electropherogram Summary Continued ...**

Sample 10



**Overall Results for sample 10 : Sample 10**

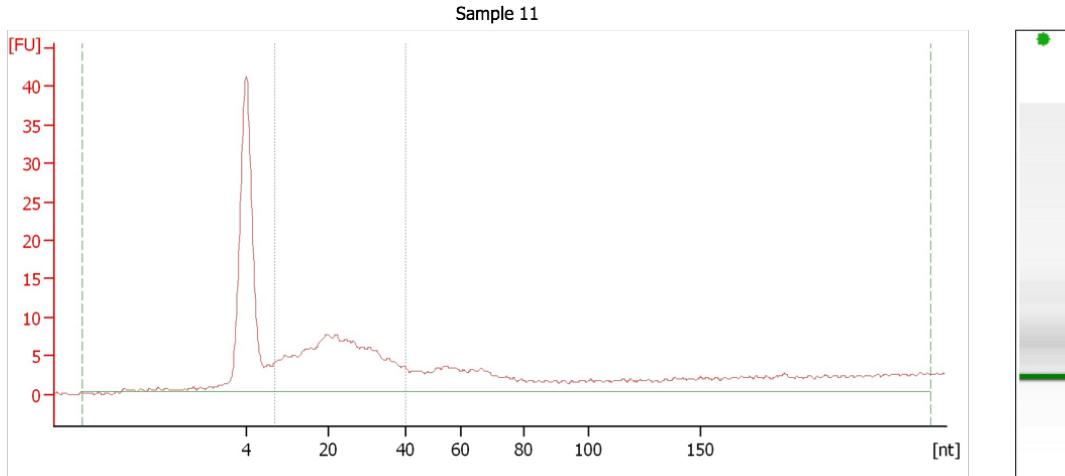
Small RNA Concentration [pg/ul]: 5.025,8  
miRNA Concentration [pg/ul]: 4.243,9  
miRNA / Small RNA Ratio [%]: 84

Result Flagging Color:             
Result Flagging Label: 84 % miRNA;  
Concentration: 4243.90 pg/ul

Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Created: 31/05/2018 11:24:36  
 Modified: 31/05/2018 12:54:38

**Electropherogram Summary Continued ...**



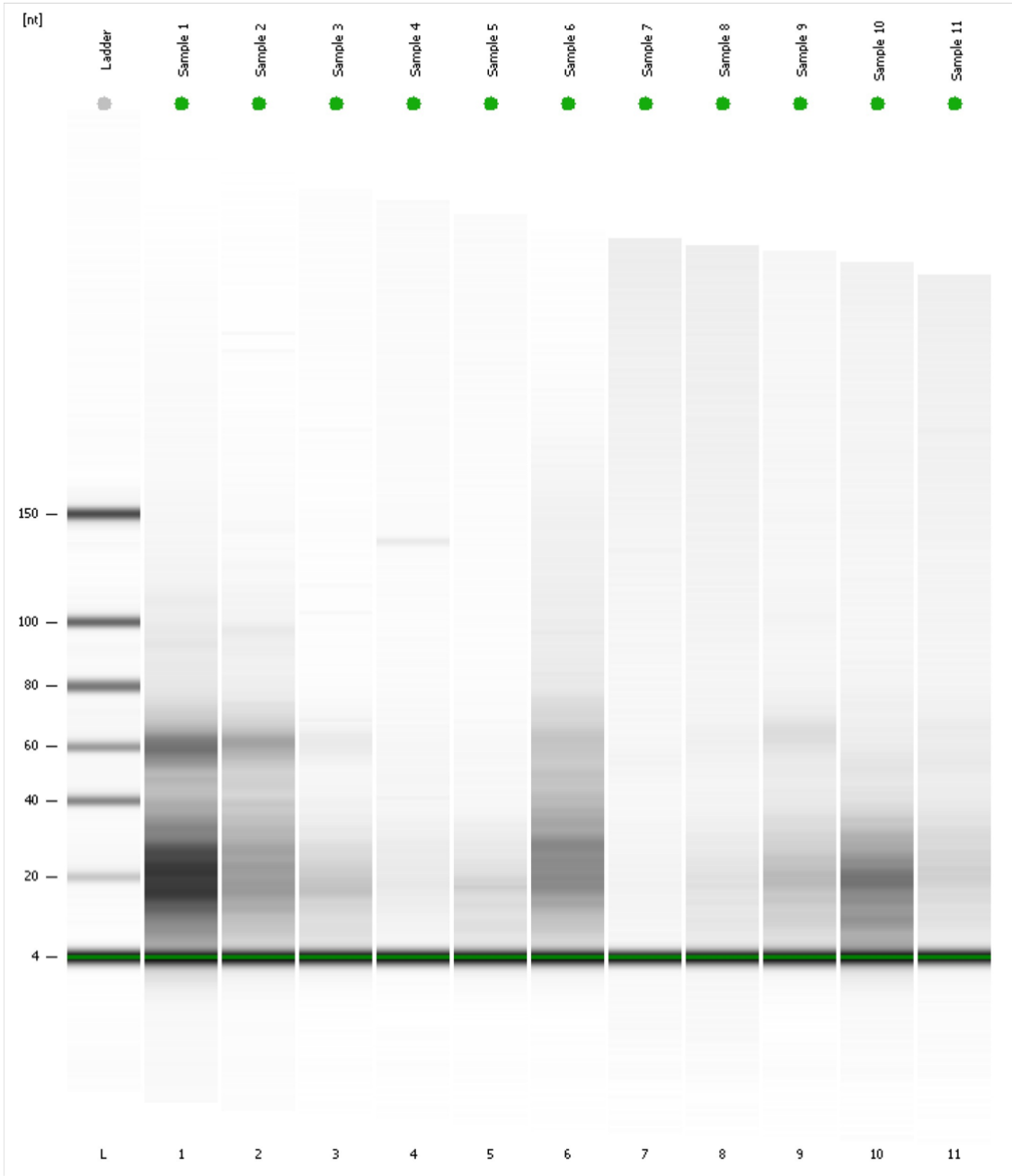
**Overall Results for sample 11 : Sample 11**

Small RNA Concentration [pg/μl]:	3.215,6	Result Flagging Color:	<span style="background-color: green; color: black;">          </span>
miRNA Concentration [pg/μl]:	2.178,2	Result Flagging Label:	68 % miRNA; Concentration: 2178.20 pg/μl
miRNA / Small RNA Ratio [%]:	68		

Assay Class: Small RNA  
Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_11-24-36.xad

Created: 31/05/2018 11:24:36  
Modified: 31/05/2018 12:54:38

**Gel Image**

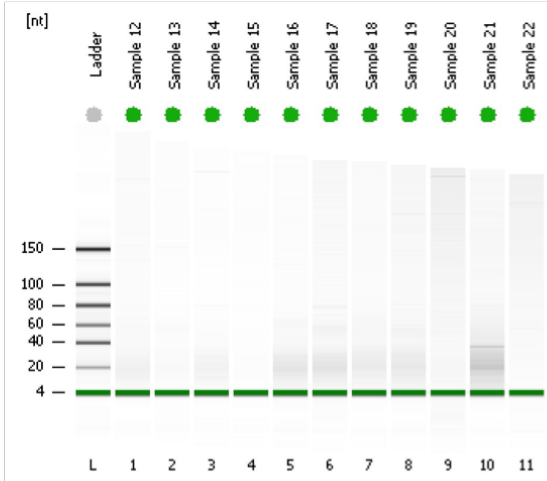




Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad

Created: 31/05/2018 12:19:39  
 Modified: 31/05/2018 12:50:27

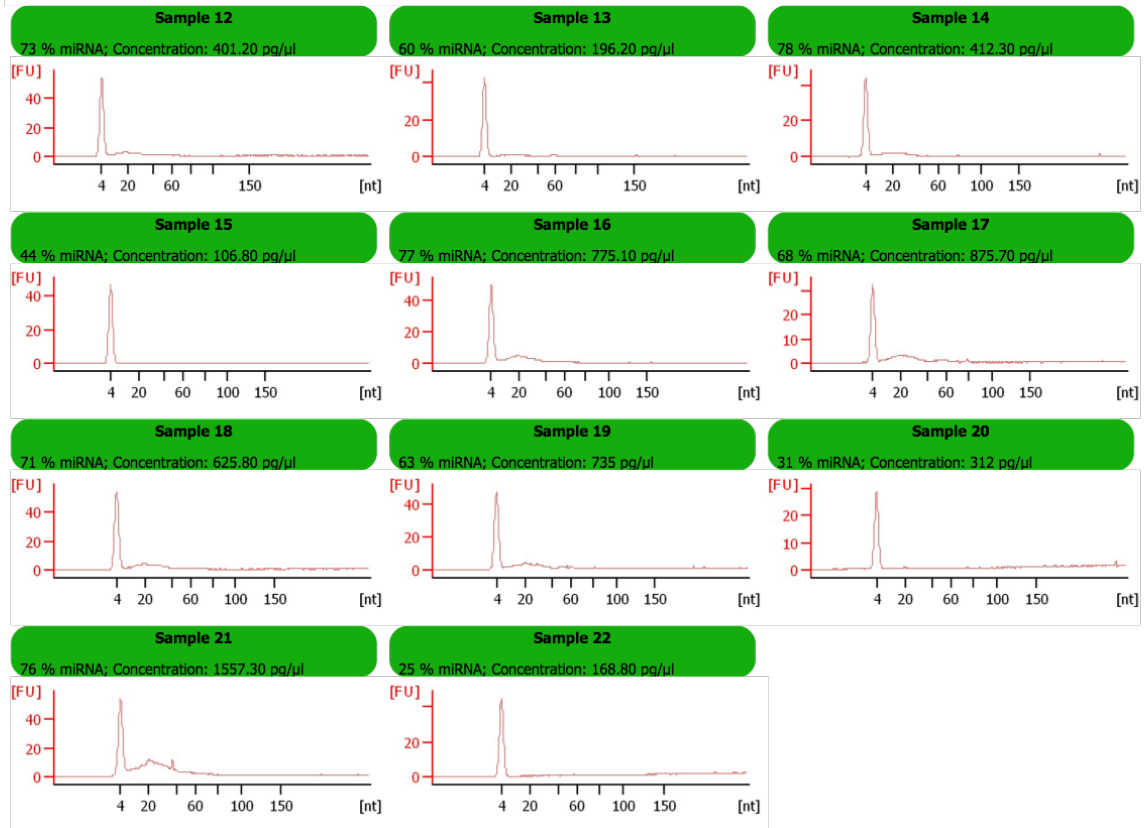
**Electrophoresis File Run Summary**



**Instrument Information:**  
 Instrument Name: DE34903744      Firmware: C.01.069  
 Serial#: DE34903744      Type: G2938C

**Assay Information:**  
 Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Small RNA Series II.xsy  
 Assay Class: Small RNA  
 Version: 1.2  
 Assay Comments: Small RNA Analysis 6 - 150 nucleotides  
 © Copyright 2007 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

**Chip Information:**  
 Chip Lot #:      Reagent Kit Lot #:      Chip Comments:



Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad  
 Created: 31/05/2018 12:19:39  
 Modified: 31/05/2018 12:50:27

**Electrophoresis File Run Summary (Chip Summary)**

Sample Name	Sample Comment	Status	Result Label	Result Color
Sample 12		✓	73 % miRNA; Concentration: 401.20 pg/μl	
Sample 13		✓	60 % miRNA; Concentration: 196.20 pg/μl	
Sample 14		✓	78 % miRNA; Concentration: 412.30 pg/μl	
Sample 15		✓	44 % miRNA; Concentration: 106.80 pg/μl	
Sample 16		✓	77 % miRNA; Concentration: 775.10 pg/μl	
Sample 17		✓	68 % miRNA; Concentration: 875.70 pg/μl	
Sample 18		✓	71 % miRNA; Concentration: 625.80 pg/μl	
Sample 19		✓	63 % miRNA; Concentration: 735 pg/μl	
Sample 20		✓	31 % miRNA; Concentration: 312 pg/μl	
Sample 21		✓	76 % miRNA; Concentration: 1557.30 pg/μl	
Sample 22		✓	25 % miRNA; Concentration: 168.80 pg/μl	
Ladder		✓	Number of Peaks: 6	
<b>Chip Lot #</b>			<b>Reagent Kit Lot #</b>	

**Chip Comments :**

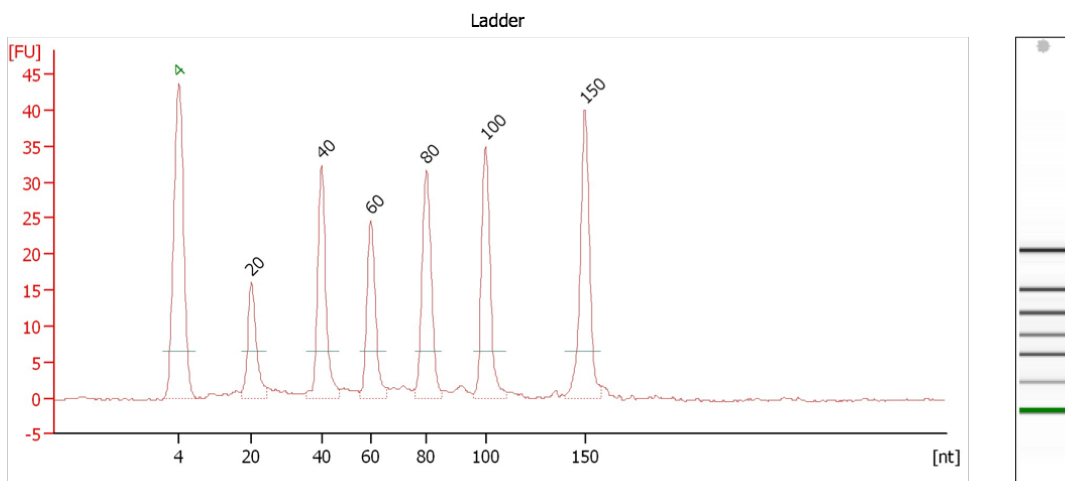
2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad

Page 3 of 15

Assay Class: Small RNA  
Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad

Created: 31/05/2018 12:19:39  
Modified: 31/05/2018 12:50:27

**Electropherogram Summary**



**Overall Results for Ladder**

Result Flagging Color:



Result Flagging Label:

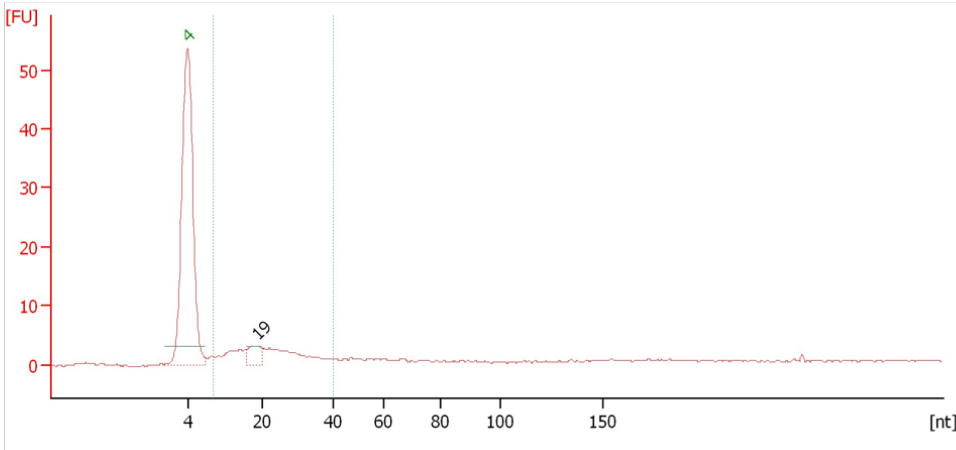
Number of Peaks: 6

Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad

Created: 31/05/2018 12:19:39  
 Modified: 31/05/2018 12:50:27

**Electropherogram Summary Continued ...**

Sample 12



**Overall Results for sample 1 : Sample 12**

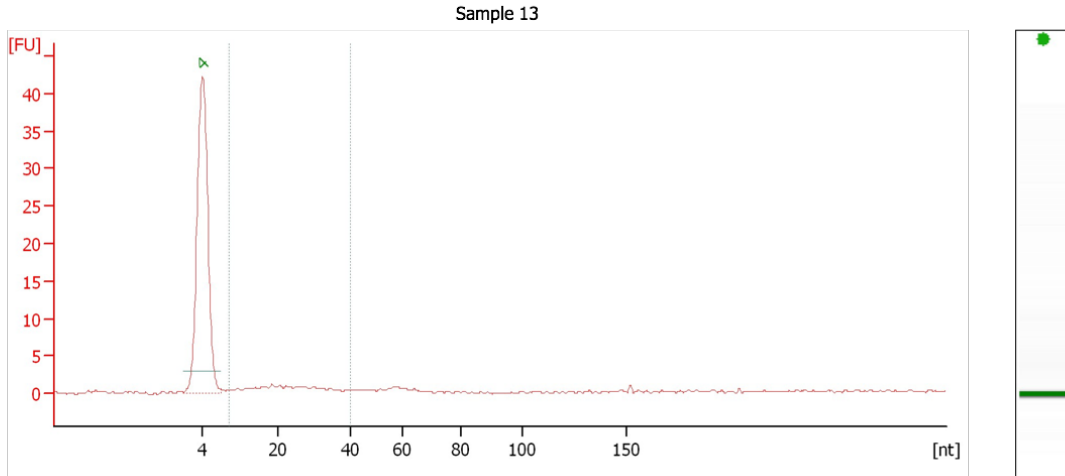
Small RNA Concentration [pg/μl]: 551,8  
 miRNA Concentration [pg/μl]: 401,2  
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 73

Result Flagging Color: ████████  
 Result Flagging Label: 73 % miRNA;  
 Concentration: 401.20  
 pg/μl

Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad

Created: 31/05/2018 12:19:39  
 Modified: 31/05/2018 12:50:27

**Electropherogram Summary Continued ...**



**Overall Results for sample 2 : Sample 13**

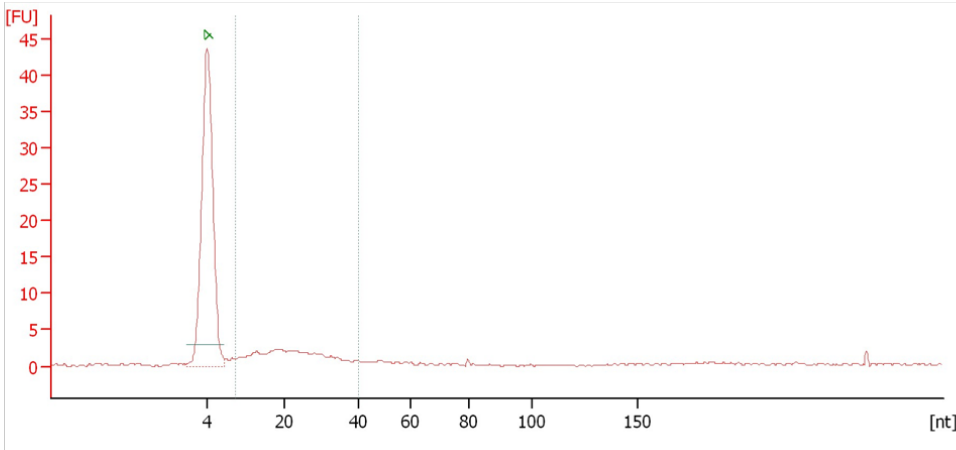
Small RNA Concentration [pg/μl]:	324,8	Result Flagging Color:	<span style="background-color: green; color: black;">          </span>
miRNA Concentration [pg/μl]:	196,2	Result Flagging Label:	60 % miRNA; Concentration: 196.20 pg/μl
miRNA / Small RNA Ratio [%]:	60		

Assay Class: Small RNA  
Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad

Created: 31/05/2018 12:19:39  
Modified: 31/05/2018 12:50:27

**Electropherogram Summary Continued ...**

Sample 14



**Overall Results for sample 3 : Sample 14**

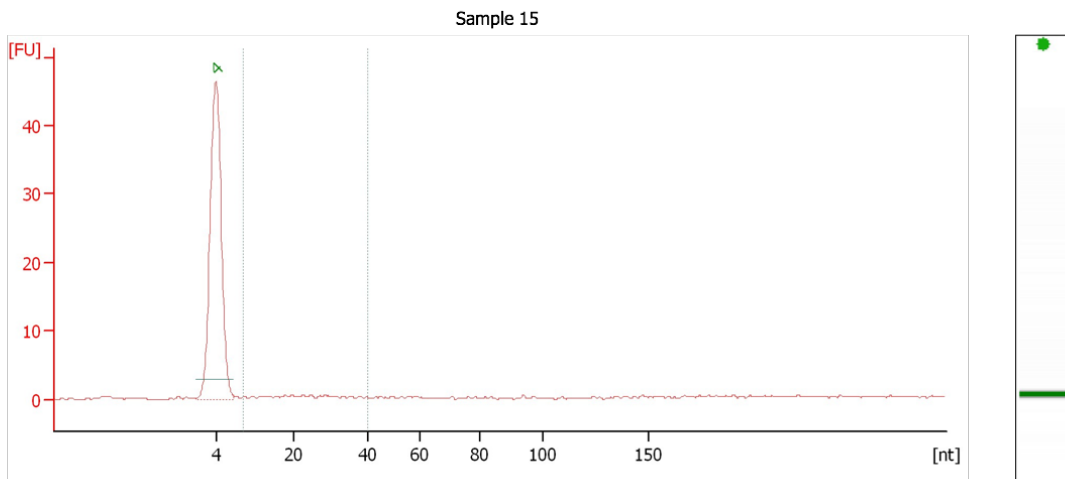
Small RNA Concentration [pg/μl]: 528,1  
miRNA Concentration [pg/μl]: 412,3  
miRNA / Small RNA Ratio [%]: 78

Result Flagging Color: ████████  
Result Flagging Label: 78 % miRNA;  
Concentration: 412.30  
pg/μl

Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad

Created: 31/05/2018 12:19:39  
 Modified: 31/05/2018 12:50:27

**Electropherogram Summary Continued ...**



**Overall Results for sample 4 :** Sample 15

Small RNA Concentration [pg/μl]: 243,5  
 miRNA Concentration [pg/μl]: 106,8  
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 44

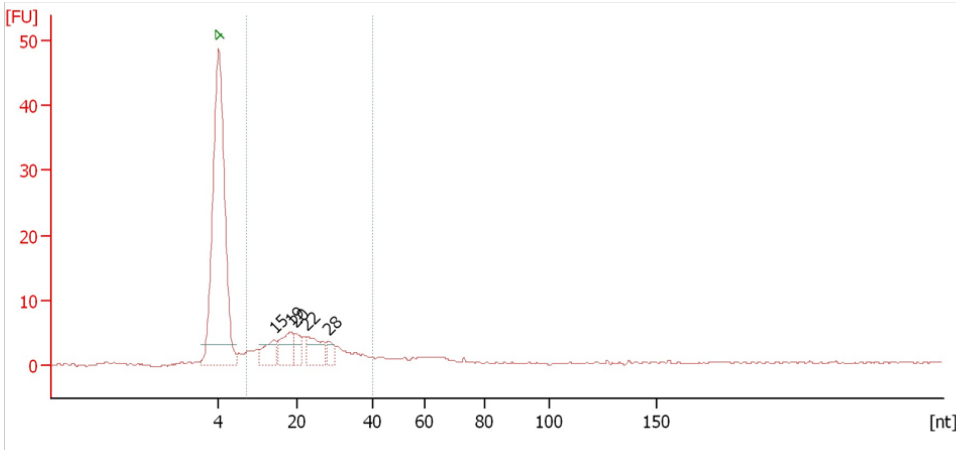
Result Flagging Color:             
 Result Flagging Label: 44 % miRNA;  
 Concentration: 106.80  
 pg/μl

Assay Class: Small RNA  
Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad

Created: 31/05/2018 12:19:39  
Modified: 31/05/2018 12:50:27

**Electropherogram Summary Continued ...**

Sample 16



**Overall Results for sample 5 : Sample 16**

Small RNA Concentration [pg/μl]: 1.003,0  
miRNA Concentration [pg/μl]: 775,1  
miRNA / Small RNA Ratio [%]: 77

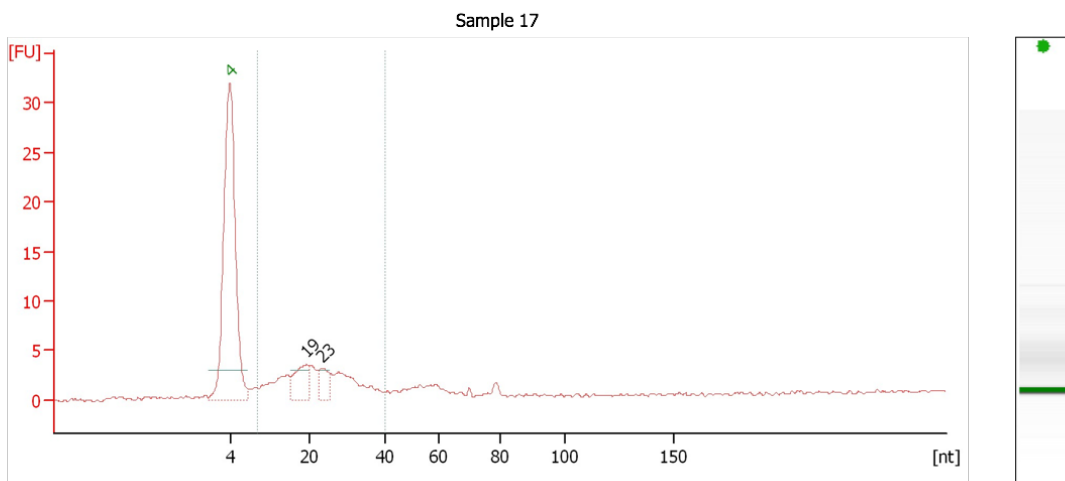
Result Flagging Color: ████████  
Result Flagging Label: 77 % miRNA;  
Concentration: 775.10  
pg/μl



Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad

Created: 31/05/2018 12:19:39  
 Modified: 31/05/2018 12:50:27

**Electropherogram Summary Continued ...**



**Overall Results for sample 6 : Sample 17**

Small RNA Concentration [pg/μl]: 1.295,2  
 miRNA Concentration [pg/μl]: 875,7  
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 68

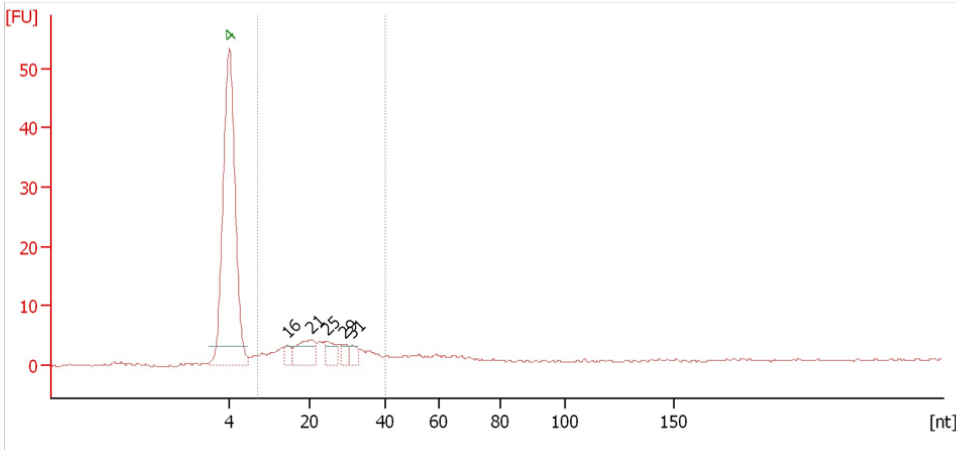
Result Flagging Color:             
 Result Flagging Label: 68 % miRNA;  
 Concentration: 875.70  
 pg/μl

Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad

Created: 31/05/2018 12:19:39  
 Modified: 31/05/2018 12:50:27

**Electropherogram Summary Continued ...**

Sample 18



**Overall Results for sample 7 :** Sample 18

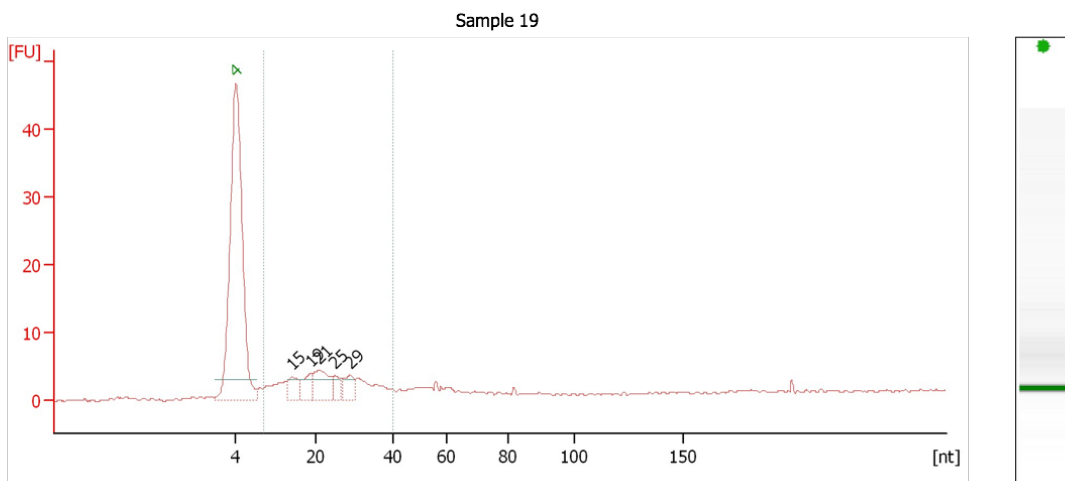
Small RNA Concentration [pg/μl]: 883,8  
 miRNA Concentration [pg/μl]: 625,8  
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 71

Result Flagging Color: ████████  
 Result Flagging Label: 71 % miRNA;  
 Concentration: 625.80  
 pg/μl

Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad

Created: 31/05/2018 12:19:39  
 Modified: 31/05/2018 12:50:27

**Electropherogram Summary Continued ...**



**Overall Results for sample 8 :** Sample 19

Small RNA Concentration [pg/μl]: 1.171,4  
 miRNA Concentration [pg/μl]: 735,0  
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 63

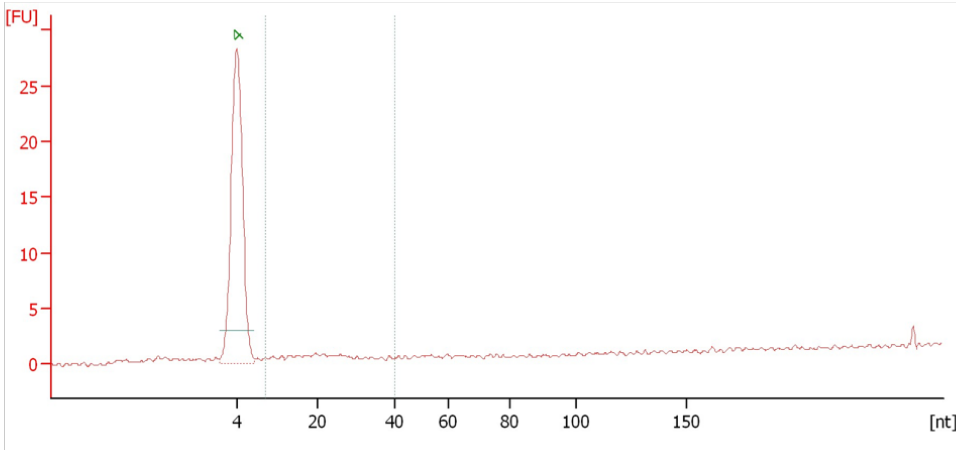
Result Flagging Color:             
 Result Flagging Label: 63 % miRNA;  
 Concentration: 735  
 pg/μl

Assay Class: Small RNA  
Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad

Created: 31/05/2018 12:19:39  
Modified: 31/05/2018 12:50:27

**Electropherogram Summary Continued ...**

Sample 20



**Overall Results for sample 9 : Sample 20**

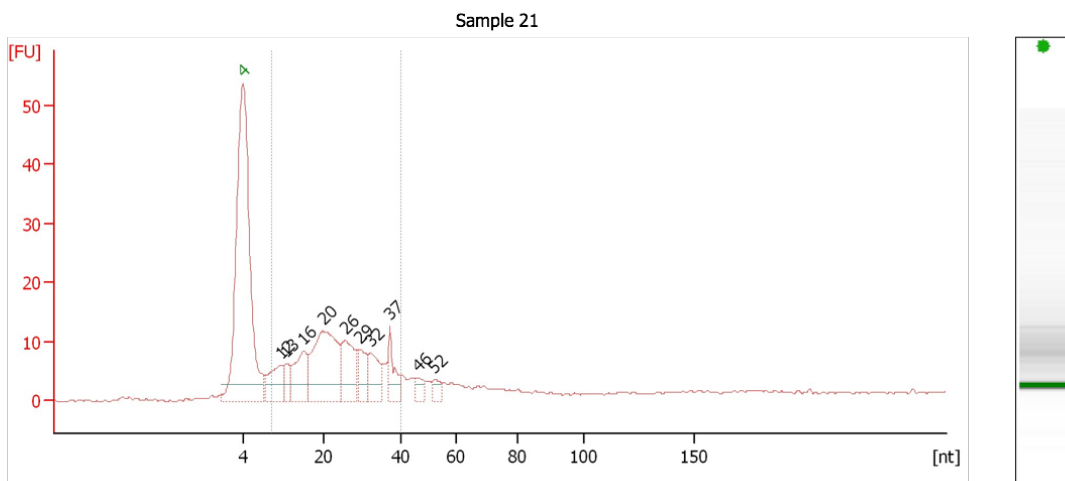
Small RNA Concentration [pg/μl]: 995,9  
miRNA Concentration [pg/μl]: 312,0  
miRNA / Small RNA Ratio [%]: 31

Result Flagging Color: ████████  
Result Flagging Label: 31 % miRNA;  
Concentration: 312  
pg/μl

Assay Class: Small RNA  
 Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad

Created: 31/05/2018 12:19:39  
 Modified: 31/05/2018 12:50:27

**Electropherogram Summary Continued ...**



**Overall Results for sample 10 : Sample 21**

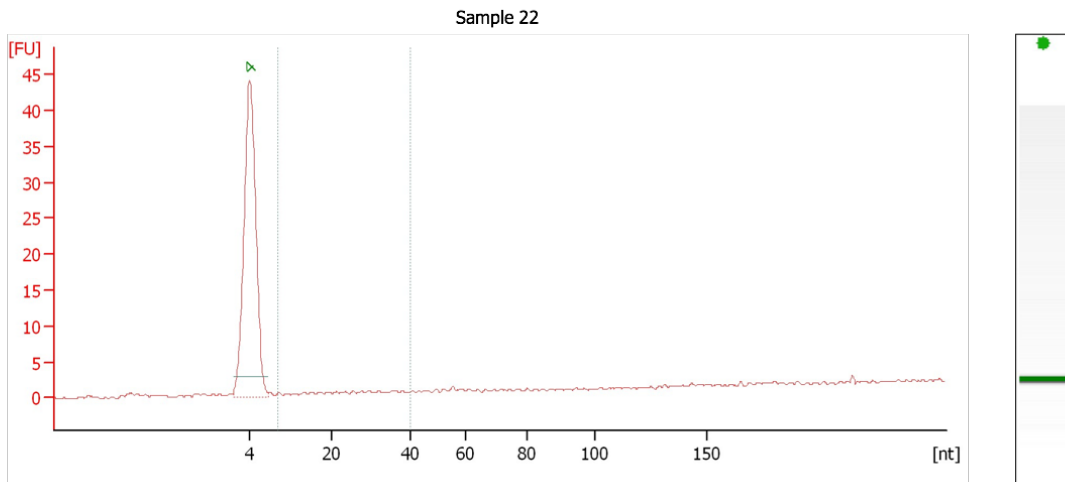
Small RNA Concentration [pg/μl]: 2.052,4  
 miRNA Concentration [pg/μl]: 1.557,3  
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 76

Result Flagging Color:             
 Result Flagging Label: 76 % miRNA;  
 Concentration: 1557.30 pg/μl


Assay Class: Small RNA  
Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad

Created: 31/05/2018 12:19:39  
Modified: 31/05/2018 12:50:27

**Electropherogram Summary Continued ...**



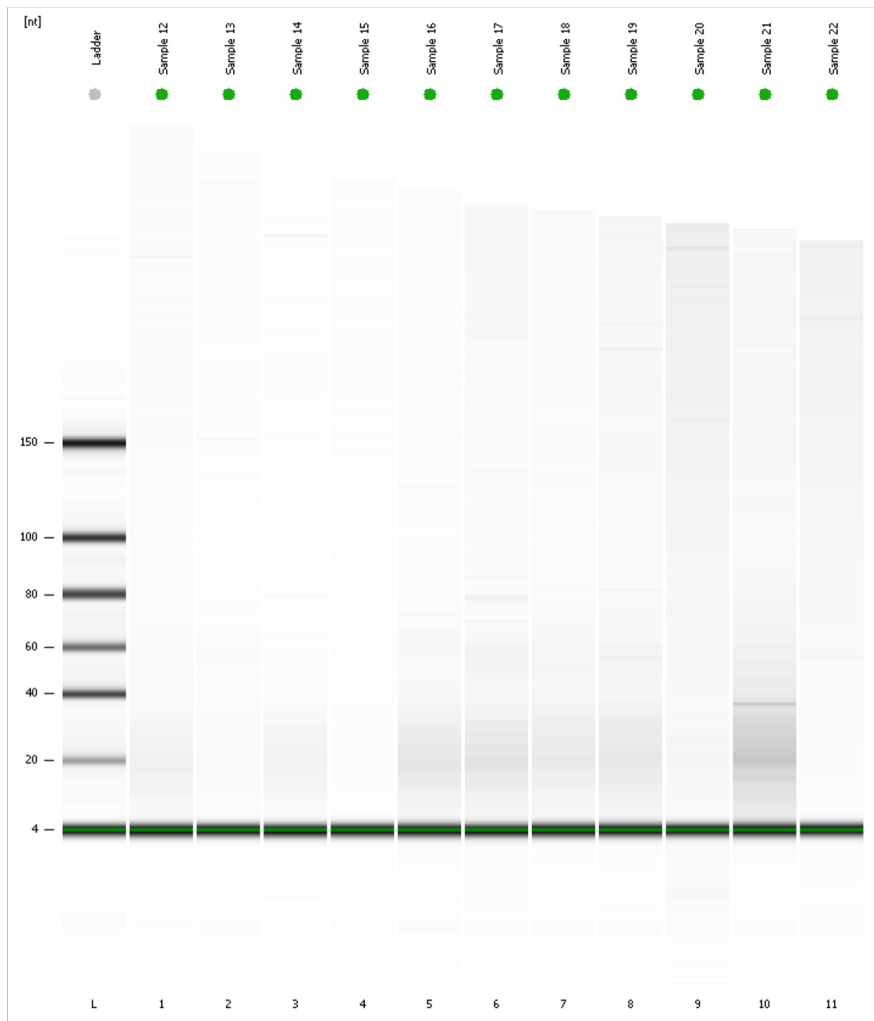
**Overall Results for sample 11 : Sample 22**

Small RNA Concentration [pg/μl]:	670,8	Result Flagging Color:	
miRNA Concentration [pg/μl]:	168,8	Result Flagging Label:	25 % miRNA; Concentration: 168.80 pg/μl
miRNA / Small RNA Ratio [%]:	25		

Assay Class: Small RNA  
Data Path: C:\...31\2100 expert\_Small RNA\_DE34903744\_2018-05-31\_12-19-39.xad

Created: 31/05/2018 12:19:39  
Modified: 31/05/2018 12:50:27

Gel Image



## Secuenciación de todos los miARNs con expresión significativa

miRNA	logFC	logCPM	PValue	FDR
hsa-miR-30a-5p	5,836904615	7,924747402	7,34101E-08	1,086E-05
hsa-miR-375	-7,68933613	17,17047014	2,04595E-06	0,0001514
hsa-miR-199a-3p	5,704360725	8,947205669	6,27788E-05	0,0025256
hsa-let-7a-5p	-4,71804207	18,79246901	6,82593E-05	0,0025256
hsa-miR-27b-3p	-5,21009215	17,06366072	9,64869E-05	0,002856
hsa-miR-92a-3p	-4,0046465	18,55396453	0,000124062	0,0030602
hsa-miR-205-5p	-4,26571276	18,56301782	0,000234391	0,0044009
hsa-miR-24-3p	-4,47808537	18,47031105	0,000237889	0,0044009
hsa-miR-199b-3p	4,855058888	8,048445068	0,000368917	0,0055241
hsa-miR-3648	4,961791761	9,766037845	0,000373252	0,0055241
hsa-miR-338-5p	4,835655507	8,618364532	0,000600762	0,008083
hsa-miR-374b-5p	4,5374868	8,416166596	0,000843982	0,0104091
hsa-miR-423-5p	-2,01701343	14,12056636	0,001374785	0,0156514
hsa-miR-429	4,253175214	8,746856355	0,001715994	0,0181405
hsa-miR-142-5p	-6,1245523	17,24718771	0,001871992	0,0184703
hsa-miR-149-5p	3,493510564	7,97828403	0,003237536	0,0299472
hsa-miR-451a	3,158572179	12,89081299	0,003888477	0,0338526
hsa-miR-223-5p	3,734841684	8,631323177	0,004219957	0,0346974
hsa-miR-31-5p	3,631292375	9,617433101	0,00452904	0,0352788
hsa-miR-181b-5p	3,305722117	8,972008646	0,007300432	0,0540232
hsa-miR-6087	3,159925614	9,399761756	0,010062732	0,0709183
hsa-miR-95-3p	3,078960392	8,152565743	0,019983989	0,1322674
hsa-miR-29c-3p	3,043303101	7,618015867	0,021478934	0,1322674
hsa-miR-1249-3p	-3,37587423	10,36314902	0,021819353	0,1322674
hsa-miR-455-3p	-4,25151248	11,44327033	0,022342468	0,1322674
hsa-miR-29b-3p	3,262884026	8,138166832	0,023352519	0,1329297
hsa-miR-345-5p	2,953225169	8,33078801	0,024797369	0,1342093
hsa-miR-769-5p	2,788448755	7,543712557	0,02539095	0,1342093
hsa-miR-26b-5p	1,616619963	12,79823742	0,033458263	0,1672592
hsa-miR-4492	2,695898335	7,564508043	0,033903896	0,1672592
hsa-miR-16-2-3p	2,724568285	8,610237865	0,041942837	0,2002432
hsa-miR-148b-3p	2,295386937	8,809682707	0,045613006	0,2109602
hsa-miR-200a-3p	2,618589142	8,922009299	0,049138185	0,2203773
hsa-miR-224-5p	1,953587596	11,50799919	0,055304523	0,2407373
hsa-miR-203a-3p	-1,67432523	16,28807584	0,063314184	0,2618661
hsa-miR-135b-5p	2,288282075	7,109395227	0,06369716	0,2618661
hsa-miR-7-5p	2,511485728	8,344397783	0,068168562	0,2726742
hsa-miR-320a	-1,04982185	13,84669166	0,090904447	0,3540489
hsa-miR-146a-5p	1,701113144	10,61314709	0,093744302	0,3557476
hsa-miR-16-5p	1,432760378	13,30006629	0,097896731	0,3622179
hsa-let-7e-5p	-1,89482635	10,94533267	0,100345047	0,3622211
hsa-miR-15b-5p	1,670049554	11,28013735	0,10563243	0,3722286
hsa-miR-320d	-2,72550661	7,883462425	0,110057121	0,3758048
hsa-miR-99a-5p	1,968794112	9,23464953	0,111725764	0,3758048
hsa-miR-361-3p	1,724087836	8,874603578	0,127901244	0,420653
hsa-miR-93-5p	1,225008572	11,49687543	0,132526998	0,423095
hsa-miR-25-3p	1,257358386	13,07651639	0,134361242	0,423095
hsa-miR-19b-3p	2,073405441	8,486998885	0,139298549	0,4295039
hsa-miR-186-5p	1,786943233	10,30171463	0,147462091	0,4453957
hsa-let-7d-3p	-1,10161936	12,39945735	0,154164047	0,4563256
hsa-miR-328-3p	-1,86638343	10,25000253	0,168598347	0,4892658



hsa-miR-27a-3p	0,826338735	12,74329494	0,172693841	0,4915132
hsa-miR-143-3p	0,99477791	13,90648515	0,188763264	0,5166299
hsa-miR-532-5p	1,688983557	7,917704662	0,194278899	0,5166299
hsa-let-7b-5p	-0,72647018	15,86842392	0,195320764	0,5166299
hsa-miR-425-5p	1,127897123	11,22900246	0,195481579	0,5166299
hsa-miR-140-5p	1,592709046	8,271069948	0,206394399	0,5359012
hsa-miR-15a-5p	1,539363089	8,534804233	0,22079291	0,5602254
hsa-miR-23a-5p	1,427809894	7,535761565	0,225554938	0,5602254
hsa-miR-101-3p	1,32843881	10,95338121	0,231471463	0,5602254
hsa-miR-361-5p	1,455440506	9,238669732	0,232676925	0,5602254
hsa-miR-29a-3p	1,209405067	11,52934222	0,234689037	0,5602254
hsa-miR-100-5p	1,358626192	7,748552676	0,249583583	0,5809658
hsa-miR-223-3p	-0,84897071	17,93193975	0,251228465	0,5809658
hsa-miR-331-3p	1,387728137	7,914932424	0,256215898	0,5833839
hsa-miR-98-5p	1,488888829	9,51260726	0,268528083	0,6021539
hsa-miR-30e-3p	1,168108476	10,1929855	0,273400464	0,6039294
hsa-miR-484	1,191033916	10,88121132	0,281836244	0,6082443
hsa-miR-197-3p	-0,91180266	12,72852002	0,283965884	0,6082443
hsa-miR-10a-5p	1,247742892	8,005978674	0,287683092	0,6082443
hsa-miR-140-3p	0,966172302	12,21835228	0,295594325	0,6161685
hsa-miR-320c	2,438866001	6,42202467	0,324949182	0,666066
hsa-miR-503-5p	-1,58048607	7,585543237	0,328532575	0,666066
hsa-miR-30e-5p	0,782759747	12,80538791	0,345917693	0,6861083
hsa-miR-23b-3p	-0,79787167	13,13547113	0,347690024	0,6861083
hsa-miR-128-3p	0,927521007	10,24598059	0,359411956	0,6999075
hsa-miR-744-5p	-0,98109676	9,210826956	0,383093995	0,7117439
hsa-miR-125a-5p	-0,74343039	13,43443247	0,389060002	0,7117439
hsa-miR-378a-3p	0,99654765	8,097670588	0,392042728	0,7117439
hsa-miR-20a-5p	-1,38087872	9,047549301	0,392944057	0,7117439
hsa-miR-182-5p	0,82646909	10,35212028	0,395021415	0,7117439
hsa-miR-1307-3p	0,874216662	8,785203824	0,404709115	0,7117439
hsa-miR-106b-3p	0,951669149	10,07806741	0,406062491	0,7117439
hsa-miR-92b-3p	-0,85692092	10,29943198	0,407466114	0,7117439
hsa-let-7c-5p	-0,77725939	11,52145356	0,413934204	0,7117439
hsa-miR-146b-5p	-0,91556884	11,72378284	0,418125016	0,7117439
hsa-miR-107	0,933665518	7,05085875	0,418945194	0,7117439
hsa-miR-1301-3p	0,838815148	7,987838971	0,426116619	0,7117439
hsa-miR-574-3p	0,981317174	8,783735549	0,435079204	0,7117439
hsa-let-7d-5p	-0,61331493	11,36810337	0,435782424	0,7117439
hsa-miR-22-3p	0,656192008	11,67672918	0,43762634	0,7117439
hsa-miR-200c-3p	0,553331185	12,91923151	0,467232095	0,7462844
hsa-miR-664a-3p	-1,14585742	8,624713849	0,471679317	0,7462844
hsa-miR-132-3p	-1,12229004	8,65481549	0,473991432	0,7462844
hsa-miR-130b-5p	0,865299088	8,352254238	0,50092677	0,7803912
hsa-miR-340-5p	-1,14027413	8,781762342	0,506533838	0,7809063
hsa-miR-26a-5p	0,357038178	15,5841617	0,513902185	0,7840982
hsa-miR-10b-5p	-1,09360067	8,675627722	0,524115182	0,7915209
hsa-miR-200a-5p	0,633860832	7,323698861	0,552131153	0,8254082
hsa-miR-150-5p	0,498440545	11,08238515	0,564380243	0,8352828
hsa-miR-125b-5p	0,532948091	10,9495377	0,582895056	0,8541433
hsa-miR-30b-5p	0,551505595	9,070330227	0,600247225	0,8646357
hsa-miR-221-3p	0,433812225	12,68333793	0,602127473	0,8646357

hsa-miR-486-5p	-0,47730237	13,54151735	0,609933053	0,8646357
hsa-miR-23a-3p	0,301582882	14,93917416	0,613423987	0,8646357
hsa-miR-4488	0,590882568	9,14396694	0,621800732	0,8664669
hsa-miR-3656	0,533667086	7,589528068	0,62643214	0,8664669
hsa-let-7f-5p	-0,3380205	13,24152372	0,633894005	0,8672247
hsa-miR-365a-3p	-0,71231889	8,708679616	0,6417288	0,8672247
hsa-miR-324-3p	-0,82915109	8,364694111	0,650640347	0,8672247
hsa-miR-145-5p	0,494621585	9,351317847	0,657739446	0,8672247
hsa-miR-652-3p	0,675038766	10,39127507	0,659386208	0,8672247
hsa-miR-99b-5p	-0,4515134	11,72156308	0,66213777	0,8672247
hsa-miR-28-3p	0,618654948	10,4993926	0,671176631	0,8710994
hsa-miR-222-3p	0,335417332	12,83333668	0,676867764	0,8710994
hsa-miR-3615	0,309297146	9,959997888	0,71817354	0,9162904
hsa-miR-148a-3p	0,311923618	12,63053088	0,727663327	0,920463
hsa-miR-942-5p	0,290032381	7,585041742	0,776434908	0,9678336
hsa-miR-106b-5p	0,274658442	7,991009883	0,778190554	0,9678336
hsa-miR-152-3p	-0,39929269	9,049884534	0,794156148	0,9778615
hsa-miR-501-3p	0,21072519	7,694609577	0,799467841	0,9778615
hsa-let-7b-3p	0,204076938	8,422401554	0,806432045	0,9782946
hsa-miR-424-3p	-0,43733139	8,29442238	0,826328249	0,9914441
hsa-miR-103a-3p	-0,19602609	12,74826171	0,83878961	0,9914441
hsa-miR-200b-5p	-0,3572971	8,140681327	0,841492924	0,9914441
hsa-miR-200b-3p	0,145670263	12,25002087	0,851875285	0,9914441
hsa-miR-151a-5p	-0,35572649	8,482417576	0,856985016	0,9914441
hsa-miR-30d-5p	-0,09845783	14,22796342	0,85746521	0,9914441
hsa-miR-342-3p	-0,23958877	11,03323137	0,870238872	0,9942406
hsa-miR-142-3p	-0,2816192	9,765818479	0,873319448	0,9942406
hsa-let-7g-5p	-0,14022718	12,40229243	0,90116278	1
hsa-miR-193b-3p	-0,25288518	9,049418201	0,908309515	1
hsa-miR-505-3p	-0,19480996	9,467819568	0,931023684	1
hsa-miR-320b	-0,08387579	8,076134729	0,935497736	1
hsa-miR-185-5p	-0,20450948	8,93822991	0,937779675	1
hsa-miR-191-5p	-0,07290837	14,37577336	0,941330395	1
hsa-miR-500a-3p	-0,21381596	8,007771795	0,946405826	1
hsa-miR-30c-5p	0,009302377	11,47755563	0,946585252	1
hsa-miR-21-5p	0,032120278	15,84024408	0,95014927	1
hsa-miR-423-3p	0,020401728	13,09030379	0,95049081	1
hsa-miR-181a-5p	0,005987954	12,26543077	0,963574664	1
hsa-let-7i-5p	-0,04862256	12,443893	0,965346195	1
hsa-miR-151a-3p	-0,05348609	8,995817035	0,97007294	1
hsa-miR-193a-5p	-0,04349725	10,24477953	0,980474725	1
hsa-miR-155-5p	-0,08106064	10,36674544	0,995736297	1
hsa-miR-183-5p	0,02017578	11,39708076	0,995988767	1
hsa-miR-365b-3p	-0,11318383	8,419806664	1	1
hsa-miR-23c	-0,09603194	3,665804417	1	1

# **GLOSARIO DE TÉRMINOS**



## GLOSARIO DE TÉRMINOS

- AA: Agregatibacter Actinomycetemcomitans
- AAP: Academia Americana de Periodoncia
- ADN: Ácido desoxiribonucleico
- AHL: Acyl Homoserin Lactone
- AKT: PKB, proteinkinasa b
- AP: periodontitis agresiva
- AP1: proteína activadora 1
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm:ARN mensajero
- ARNnc: ARN no codificante
- ARNpno: ARN nucleolar pequeño
- ARNr: ARN ribosómico
- ARNt:ARN de transferencia
- AUC: área bajo la curva
- BCR: receptores de células B
- BMP: Proteínas morfogenéticas óseas
- COX: ciclooxigenasa
- Cpm: conteo por millón
- CPNS: no fumadores periodontitis crónica
- CPS:fumadores periodontitis crónica
- CR: Campylobacter Rectus
- Ct: umbral de ciclos
- DKK: Dickkopf
- DNMT: Metiltransferasas de ADN
- EFP: Federación Europea de Periodoncia
- EGF: factor de crecimiento epidermoide
- EGF: factor de crecimiento epitelial
- EGFR o ErbBR:receptor del factor de crecimiento epitelial
- EMMPRIN: inductor extracelular de las MMPs
- ERE:epitelio reducido del esmalte

## Glosario de términos

ERK: kinasa regulada extracelularmente

FB: fibroblasto

FBGF: factor de crecimiento del fibroblasto

FC: fold change, nivel de expresión

FCG: Fluido Crevicular Gingival

FU: señal de fluorescencia

GE: gingivitis experimental

GUN: Gingivitis ulcero-necrotizante

HbA1c: Hemoglobina glicosilada

HGF: factor de crecimiento del hepatocito

HIF: factor inducido por hipoxia

HO-1: hemooxigenasa 1

IC: interval de confianza

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1

IFN $\gamma$ : interferón gamma

IgA: Inmunoglobulina A

IGF: factor de crecimiento insulina

IgG: inmunoglobulina G

IL-1 $\beta$ : interleucina 1-beta

IL: Interleucina

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

KGF: factor de crecimiento del queratinocito

LAC: línea amelo-cementaria

LP: Ligamento Periodontal

LPS: Lipopolisacáridos

M-CSF: factor estimulador de la colonia de macrófagos

MA: edad media

MAPKs: proteína kinasa activada por mitógeno

MEC: matriz extracelular

miARN: micro ARN

miR: micro ARN

MMP: Metaloproteasas de la matriz

mTOR: mammalian target of rapamycine

NCI: nivel de inserción clínica

ND: no datos

NF- $\kappa$  $\beta$ : Factor nuclear kappa-beta

NFATc1: factor nuclear de células T activadas

ng: nanogramo

NGS: Secuenciación de nueva generación

nt: nucleótidos

OPG: Osteoprotegerina

ORA: análisis de sobrerrepresentación génica

OXPPOS: fosforilación oxidativa

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PAR: receptores asociados a patógenos

Pb: pares de bases

PC: periodontitis crónica

PCA: análisis principal de componentes

PCR: reacción en cadena a la polimerasa

PG: Porphyromonas Gingivalis

PGE2: Prostaglandina E2

PI: Prevotella Intermedia

PI3k: fosfatidilinositol 3 kinasa

PIC: pérdida de inserción clínica

PKB: proteína kinasa b

PMN: polimormonuclear

PS: Profundidad de sondaje

PUN: \_periodontitis ulcero-necrotizante

RANK-L: Ligando para el receptor activador para el nuclear factor-kappa beta

RANK: Receptor activador para el nuclear factor-kappa beta)

ROC :Receiver Operating Characteristic

ROS: especies reactivas de oxígeno

RT: retrotranscripción

RvE1: Resolvina E1

SD: desviación estándar

sFRPs: proteínas secretadas frizzled-related

Smurf-1: Smad ubiquitin regulatory factor one

Glosario de términos

SOST: esclerostina

SS: sangrado al sondaje

TCR: receptores de células T

TD: Treponema Denticola

TF: Tannarella Forsythus

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta

TIMP: inhibidores tisulares de las metaloproteasas

TJ: uniones estrechas

TLR: receptors tipo toll

TNF: Factor de necrosis tumoral

UCSC Universidad de California Santa Cruz

UDG: unión dento gingival

UV: Universitat de València

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

Wnt: familia de proteínas ligandos wingless/integrase

$\mu$ g: microgramos

$\mu$ g/ml: microgramos/ml

$\mu$ l: microlitro