



FACULTADE DE MEDICINA
E ODONTOLOXÍA

Traballo de
fin de grao

Impacto do hábito tabáquico no proteoma subxinxival de pacientes con periodontite

Impacto del hábito tabáquico en el proteoma subgingival de pacientes con periodontitis

Impact of smoking on subgingival proteome in patients with periodontitis

Autora: Iria Seijo Porto

Titira: Dra. Inmaculada Tomás Carmona

Cotitora: Triana Blanco Pintos

Departamento: Cirurxía e Especialidades Médico-Cirúrxicas

Xullo 2023

Traballo de Fin de Grao presentado na Facultade de Medicina e Odontoloxía da Universidade de Santiago de Compostela para a obtención do Grao en Odontoloxía.

Agradecimientos

A la Dra. Inmaculada Tomás, por ser mi tutora, por la oportunidad, por su compromiso e implicación en este trabajo, así como también por todo lo aprendido al haberme hecho un lugar este tiempo en su Unidad de Pacientes con Necesidades Especiales (USC).

A todas mis compañeras allí, en especial a Triana, por su cercanía y por haberme ayudado a seguir sus pasos en el desarrollo de este estudio.

Con todo, muchas gracias por supuesto también a mi familia por todo su apoyo en estos años.

Índice

Resumo	3
1. Introducción	6
2. Material y métodos	8
2.1 Sujetos de estudio y variables clínicas de interés	8
2.2 Recogida de las muestras de fluido crevicular gingival y su preparación para el análisis de espectrometría de masas	9
2.3 Análisis cuantitativo de proteínas por SWATH-MS	10
2.3.1 Construcción de las bibliotecas espectrales MS/MS.....	10
2.3.2 Cuantificación relativa	10
2.4 Análisis estadístico	11
2.4.1 Comparación de las características clínicas entre pacientes con periodontitis no fumadores, fumadores y exfumadores	11
2.4.2 Evaluación de la estructura del proteoma periodontal	12
2.4.3 Evaluación de la expresión diferencial de proteínas	12
3. Resultados	13
3.1 Comparación de las características clínicas de pacientes periodontales no fumadores, fumadores y exfumadores	13
3.2 Estructura del proteoma periodontal en FCG.....	15
3.3 Expresión diferencial de las proteínas cuantificadas en FCG	18
3.3.1 Grupo de no fumadores comparado con grupo de fumadores	19
3.3.2 Grupo de no fumadores comparado con grupo de exfumadores.....	22
3.3.3 Grupo de exfumadores comparado con grupo de fumadores.....	24
3.3.4 Comparación de los resultados obtenidos en los tres grupos clínicos	26
4. Discusión	27
4.1 Técnica SWATH-MS para el análisis del proteoma periodontal	27
4.2 Evidencia sobre el impacto del hábito tabáquico sobre el proteoma periodontal	28
4.3 Análisis de la estructura del proteoma periodontal en FCG.....	30
4.4 Expresión diferencial de las proteínas cuantificadas	30
4.4.1 Grupo de no fumadores comparado con grupo de fumadores	30
4.4.2 Grupo de no fumadores comparado con grupo de exfumadores.....	33
4.4.3 Grupo de exfumadores comparado con grupo de fumadores.....	34
4.4.4 Comparación de los resultados obtenidos en los tres grupos clínicos	35
5. Conclusiones	37
Referencias bibliográficas	38
Apéndice S1: Comité ético	45

Resumo

Obxectivo: Analizar a estrutura do proteoma periodontal e a expresión diferencial das proteínas detectadas en fluído crevicular xinxival (FCX) de pacientes periodontais non fumadores, fumadores e exfumadores, mediante “sequential window acquisition of all theoretical mass spectra” (SWATH-MS), para investigar o impacto do hábito do tabaquismo no proteoma periodontal.

Material e métodos: Recolléronse mostras de FCX de 40 suxeitos con periodontite en estadio III-IV segundo a clasificación de 2018, divididos en tres grupos de acordo co hábito de fumar: 13 non fumadores, 17 fumadores e 10 exfumadores. As mostras analizáronse mediante a técnica proteómica SWATH-MS, e as proteínas identificáronse empregando a base de datos UniProt específica para humanos. Primeiro, avalíouse a estrutura do proteoma periodontal mediante análise de compoñentes principais (ACP) nos tres grupos clínicos; e logo, comparouse a expresión das proteínas cuantificadas. As proteínas cun valor $p < 0,05$ e un tamaño do efecto absoluto $> 0,2$ consideráronse diferencialmente expresadas.

Resultados: Cuantificáronse 250 proteínas no FCX. A estrutura do proteoma non foi diferente entre non fumadores, fumadores e exfumadores. Considerando a expresión proteica, 23 moléculas expresáronse de forma diferencial en non fumadores fronte fumadores, das cales sete estiveron sobreexpresadas (tamaño do efecto: 0,85) e 16 subexpresadas (-0,24 – -1,24). En non fumadores fronte exfumadores, 17 proteínas atopáronse diferencialmente expresadas, 15 sobreexpresadas (0,54 – 1,26) e dúas subexpresadas (-0,90 – -0,92). Por último, oito proteínas detectáronse con expresión diferencial en exfumadores fronte a fumadores, unha regulada á alza (1,07) e sete reguladas á baixa (-0,53 – -0,95).

Conclusións: Aínda que a estrutura do proteoma non é significativamente diferente entre os tres grupos clínicos, en pacientes periodontais fumadores, hai diversas proteínas diferencialmente expresadas con respecto aos suxeitos que nunca fumaron, potenciándose varias queratinas vinculadas á inmunidade innata e proteínas asociadas á progresión da periodontite. Ademais, o tabaco induce unha menor expresión de inmunoglobulinas, persistindo este efecto sobre a inmunidade humoral incluso anos despois de ter deixado de fumar.

Palabras chave: fluído crevicular xinxival, periodontite, espectrometría de masas, SWATH-MS, proteómica, tabaquismo.

Resumen

Objetivo: Analizar la estructura del proteoma periodontal y la expresión diferencial de las proteínas detectadas en fluido crevicular gingival (FCG) de pacientes periodontales no fumadores, fumadores y exfumadores, mediante “sequential window acquisition of all theoretical mass spectra” (SWATH-MS), para investigar el impacto del hábito tabáquico en el proteoma periodontal.

Material y métodos: Se recogieron muestras de FCG de 40 sujetos con periodontitis en estadio III-IV según la clasificación de 2018, divididos en tres grupos de acuerdo con el hábito tabáquico: 13 no fumadores, 17 fumadores y 10 exfumadores. Las muestras se analizaron mediante la técnica proteómica SWATH-MS, y las proteínas se identificaron empleando la base de datos UniProt específica para humanos. Primero, se evaluó la estructura del proteoma periodontal de las muestras de FCG mediante análisis de componentes principales (ACP) en los tres grupos clínicos; y luego, se comparó la expresión de las proteínas cuantificadas. Las proteínas con un valor $p < 0,05$ y un tamaño del efecto absoluto $> 0,2$ se consideraron diferencialmente expresadas.

Resultados: Se cuantificaron 250 proteínas en el FCG. La estructura del proteoma no fue significativamente diferente entre no fumadores, fumadores y exfumadores. Considerando la expresión proteica, 23 moléculas se expresaron de forma diferencial en no fumadores frente a fumadores, de las cuales siete estuvieron sobreexpresadas (tamaño do efecto: 0,85) e 16 subexpresadas (-0,24 – -1,24). En no fumadores frente a exfumadores, 17 proteínas se encontraron diferencialmente expresadas, 15 sobreexpresadas (0,54 – 1,26) y dos subexpresadas (-0,90 – -0,92). Por último, ocho proteínas se detectaron con expresión diferencial en exfumadores frente a fumadores, una regulada al alza (1,07) y siete reguladas a la baja (-0,53 – -0,95).

Conclusiones: Aunque la estructura del proteoma no es significativamente diferente entre los tres grupos clínicos, en pacientes periodontales fumadores, hay diversas proteínas diferencialmente expresadas con respecto a los sujetos que nunca han fumado, potenciándose varias queratinas vinculadas a la inmunidad innata y proteínas asociadas a la progresión de la periodontitis. Además, el tabaco induce una menor expresión de inmunoglobulinas, persistiendo este efecto sobre la inmunidad humoral incluso años después de haber dejado de fumar.

Palabras clave: biomarcadores moleculares, fluido crevicular gingival, periodontitis, espectrometría de masas, SWATH-MS, proteómica, tabaquismo.

Abstract

Aim: To analyse the structure of the periodontal proteome and the differential expression of proteins detected in gingival crevicular fluid (GCF) from non-smoking, smoking and former smoking periodontal patients, by “sequential window acquisition of all theoretical mass spectra” (SWATH-MS), to investigate the impact of smoking on the periodontal proteome.

Material and methods: GCF samples were collected from 40 subjects with stage III-IV periodontitis according to the 2018 classification, divided into three groups according to smoking status: 13 non-smokers, 17 smokers and 10 former smokers. The samples were analysed using the proteomic technique SWATH-MS, and proteins were identified employing UniProt human-specific database. First, the periodontal proteome structure of the GCF samples was assessed using principal component analysis (PCA) in the three clinical groups, and then expression of the quantified proteins was compared. Those proteins with a p-value <0.05 and an absolute effect size >0.2 were considered differentially expressed.

Results: A total of 250 proteins in GCF were quantified. The proteome structure was not significantly different between non-smokers, smokers and former smokers. Considering protein expression, 23 molecules were differentially expressed in non-smokers *vs* smokers, of which seven were upregulated (effect size: 0.85) and 16 were downregulated (-0.24 – -1.24). In non-smokers *vs* former smokers, 17 proteins were found differentially expressed, 15 upregulated (0.54 – 1.26) and two downregulated (-0.90 – -0.92). Finally, eight proteins were detected differentially expressed in former smokers *vs* smokers, one upregulated (1.07) and seven downregulated (-0.53 – -0.95).

Conclusions: Although the proteome structure is not significantly different between the three clinical groups, in periodontal smokers, several proteins are differentially expressed compared to never smokers, enhancing several keratins linked to innate immunity and proteins associated with the progression of periodontitis. In addition, smoking induces a lower expression of immunoglobulins, and this effect on humoral immunity persists even years after smoking cessation.

Keywords: molecular biomarkers, gingival crevicular fluid, periodontitis, mass spectrometry, SWATH-MS, proteomics, smoking.

1. Introducción

Actualmente, las enfermedades periodontales son una de las condiciones orales más prevalentes a nivel mundial suponiendo un preocupante problema de salud pública (1). En 2017, se estimó que la periodontitis severa afecta a cerca de 800 millones de personas en el mundo, con una prevalencia estandarizada por edad de aproximadamente el 10% (2). Asimismo, entre 1990 y 2019, esta tasa aumentó alrededor de un 8%, debido principalmente al crecimiento de la población mundial por lo que se espera que siga aumentando en las próximas décadas (3).

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta al tejido blando que rodea los dientes (encía), al hueso y al ligamento periodontal que ancla el diente al hueso alveolar (4). La etiología de esta enfermedad es multifactorial, siendo los más relevantes el biofilm microbiano y el sistema inmune del huésped. La disbiosis del microbioma oral provoca una sobreactivación del sistema inmunológico, que activa a su vez la función osteoclástica, provocando la reabsorción del hueso alveolar y, en última instancia, pudiendo conducir a la pérdida dental (5-7).

Las enfermedades periodontales no sólo deterioran la salud bucodental, sino que también afectan profundamente aspectos físicos, sociales y psicológicos de la calidad de vida del paciente (8). Además, actualmente hasta 57 enfermedades sistémicas han demostrado estar relacionadas con la periodontitis de forma bidireccional (9), incluyendo las enfermedades cardiovasculares (10), la diabetes mellitus (11), la enfermedad de Alzheimer (12) y resultados adversos durante el embarazo (13).

Aunque la inflamación gingival causada por la acumulación de placa es un factor patogénico necesario para la periodontitis (6), sólo deriva en periodontitis en aquellas personas susceptibles de padecer la enfermedad (4). Existen varios factores de riesgo asociados al desarrollo de la periodontitis, los cuales pueden ser no modificables (por ejemplo, la edad, el sexo, la genética y el origen étnico), pero la mayoría de ellos son modificables, ya que están relacionados con enfermedades sistémicas o hábitos (por ejemplo, la higiene oral o el tabaquismo) (14). El tabaquismo es considerado un verdadero factor de riesgo para el desarrollo de la periodontitis, puesto que incrementa la probabilidad de que ocurra en un 85% (15); mientras que su abandono reduce el riesgo de periodontitis a un nivel comparable al de quienes nunca fumaron (16).

Además, durante los últimos años, se ha demostrado que varias proteínas detectadas en el fluido crevicular gingival (FCG) desempeñan un papel esencial en el inicio, progresión y severidad de la periodontitis (17), aunque se ha evidenciado que algunas de ellas se ven afectadas por el hábito tabáquico (18-20). Esto podría estar relacionado con que el tabaco influye en la patogénesis de la periodontitis a través de vías sistémicas y locales, afectando tanto a la microbiota oral como a la respuesta inmunitaria del huésped (21). Sin embargo, resulta necesario seguir investigando para aclarar su influencia en el proteoma periodontal (21).

En este sentido, las técnicas proteómicas de alto rendimiento y, en particular, la cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (“liquid-chromatography tandem mass spectrometry”, LC-MS/MS), han surgido como métodos que permiten estudiar el proteoma periodontal de forma más exhaustiva y, por tanto, contribuyen a una comprensión más amplia y profunda de los perfiles proteicos asociados a la periodontitis (17, 22). Teniendo en cuenta los distintos métodos de LC-MS/MS, actualmente las técnicas sin etiquetado (“label-free”) son las más empleadas, ya que son más asequibles, se asocian a una preparación de muestras más sencilla y pueden admitir mayores tamaños muestrales que las técnicas de etiquetado (23). Por otra parte, considerando las estrategias de adquisición de datos, “selected-reaction monitoring” (SRM) sigue siendo el método de cuantificación de referencia (24). Sin embargo, debido a su baja cobertura del proteoma de la muestra (23), la adquisición independiente de datos (AID) no dirigida ha surgido como alternativa, ya que teóricamente permite cuantificar todas las moléculas presentes en la muestra (24).

En consonancia con estas técnicas, se ha desarrollado el método “sequential window acquisition of all theoretical mass spectra” (SWATH-MS). SWATH-MS combina la identificación de péptidos mediante un modo de adquisición dependiente de datos (ADD) con un enfoque AID para extraer información cuantitativa de las proteínas previamente identificadas (25). Estas características la convierten en una estrategia eficaz para cuantificar un gran número de proteínas con una consistencia y precisión similares a la SRM dirigida (23). En consecuencia, a pesar de su reciente desarrollo, SWATH-MS ha atraído rápidamente el interés de la comunidad científica (23), demostrando resultados prometedores en diversas áreas clínicas (26, 27).

Estos diferentes enfoques proteómicos condujeron al descubrimiento de múltiples proteínas del FCG, con perfiles de expresión significativamente distintos en función del estado periodontal (28-30). Sin embargo, la influencia del hábito tabáquico en este perfil proteómico ha sido escasamente evaluado. Stein et al. observaron diferencias en el proteoma del FCG de pacientes

con periodontitis entre fumadores y no fumadores (31), mientras que Grant et al. demostraron que la expresión de ciertos péptidos antimicrobianos en saliva varía entre sujetos sanos y con periodontitis de acuerdo con el hábito tabáquico (32). Además, hasta el momento, no se ha evaluado la influencia del cese del hábito tabáquico en el proteoma periodontal. Asimismo, la técnica SWATH-MS aún no ha sido aplicada para analizar el proteoma periodontal (33).

Por consiguiente, el **objetivo** de este estudio transversal fue analizar la estructura del proteoma periodontal y la expresión diferencial de las proteínas detectadas en FCG mediante SWATH-MS de sujetos con periodontitis diferenciando por hábito tabáquico en tres grupos: no fumadores, exfumadores y fumadores.

2. Material y métodos

2.1 Sujetos de estudio y variables clínicas de interés

Se reclutó una muestra por conveniencia de 40 individuos con periodontitis, a partir de 150 pacientes consecutivos de la población general que fueron remitidos a la Facultad de Medicina y Odontología (Universidad de Santiago de Compostela, España) entre 2022 y 2023 para una evaluación de su estado de salud oral.

La muestra de estudio estuvo constituida por sujetos sistémicamente sanos que cumplían los siguientes criterios de inclusión: 1) edad entre 20-75 años, 2) presencia de al menos 10 dientes naturales, 3) no haber recibido tratamiento periodontal previo, 4) no presentar enfermedades sistémicas; 4) no embarazo o lactancia, 5) no haber ingerido antibióticos en los 6 meses previos o antiinflamatorios en los 4 meses previos, 6) no usar antisépticos de forma rutinaria, 7) no presentar caries activas, periodontitis apical, infección dentaria ni infecciones asociadas a mucosas, 8) no antecedentes de abuso de alcohol o drogas, 9) ausencia de aparatos de ortodoncia, 10) no haber fumado nunca (no fumador), haber fumado durante al menos un año (fumador), o haber dejado de fumar hace al menos un año independientemente del tiempo que había fumado (exfumador).

Dos odontólogos experimentados y previamente calibrados efectuaron el diagnóstico periodontal, analizando los parámetros clínicos (variables clínicas de interés): profundidad de sondaje (PS), pérdida de inserción clínica (PIC), grado de sangrado al sondaje (SS) y niveles de placa bacteriana (NPB). El registro del SS y de NPB se realizó en toda la boca con una escala binaria (presencia/ausencia) en seis puntos por diente. La PS y la PIC se registraron con una sonda

PCP-UNC 15, también en seis puntos por diente. Se realizó un estudio radiográfico basado en una ortopantomografía y una serie periapical de todos los dientes. El diagnóstico de la condición oral se basó en la información clínica y radiográfica obtenida. A los pacientes seleccionados se les diagnosticó periodontitis en estadios III a IV habiéndose aplicado los nuevos criterios de clasificación publicados en 2018 (34,35). Las características del hábito tabáquico se recogieron mediante la aplicación de un cuestionario con información recogida sobre su grado (no fumador, fumador actual o exfumador), tiempo que lleva fumando (fumador) o que ha fumado y tiempo sin fumar (exfumador) y número de cigarrillos consumidos al día. De acuerdo con esta variable, la muestra de estudio se dividió en tres grupos: pacientes con periodontitis no fumadores, fumadores y exfumadores (10 no fumadores, 12 fumadores y 8 exfumadores en estadio III; 3 no fumadores, 5 fumadores y 2 exfumadores en estadio IV).

El estudio se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki (revisada en 2000) sobre estudios que implican experimentación con seres humanos (36). El protocolo del estudio fue sometido a la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CAEIG) (número de registro 2021/417) (Apéndice S1). Los pacientes fueron informados verbalmente y mediante una hoja explicativa sobre el propósito del proyecto y firmaron un consentimiento informado para poder formar parte del mismo.

2.2 Recogida de las muestras de fluido crevicular gingival y su preparación para el análisis de espectrometría de masas

Se recogieron muestras de FCG de cada paciente en los primeros 7-14 días después de la exploración intraoral. Las muestras de FCG de los pacientes se recogieron y agruparon a partir de 5 sitios proximales no adyacentes seleccionándose los sitios con mayor PS. Se introdujeron dos puntas de papel en la bolsa periodontal durante 30 segundos. En caso de contaminación visible con sangre, se desecharon y se tomaron nuevas muestras. Las puntas recogidas se introdujeron en tubos etiquetados con 300 µl de solución salina tamponada con fosfato 0,01M y un pH de 7,2. Inmediatamente después, las muestras se almacenaron a -80 °C hasta el análisis.

Las concentraciones de proteínas totales de las muestras de FCG se cuantificaron con el RCDC Protein Assay Kit (BIORAD, Hercules, California, USA). Utilizando metanol/cloroformo (MeOH/CHCl₃), se eliminaron posibles contaminantes como ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o lípidos presentes en las muestras de FCG.

Las proteínas del FCG purificadas se concentraron en una banda para poder realizar la digestión "en gel" utilizando electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) al 10%. La electroforesis se detuvo cuando el frente penetró 3 mm en el gel (37, 38) y se procedió a la digestión trípica manual.

A continuación, las piezas de gel se lavaron con bicarbonato de amonio en MeOH al 50% (HPLC grade, Scharlau, Barcelona, España), se deshidrataron mediante acetonitrilo (HPLC grade, Scharlau) y se secaron. Se añadió tripsina porcina modificada (Promega, Madison, Wisconsin, USA) a los trozos de gel secos, incubándolos a 37 °C durante 16 horas. Los péptidos se extrajeron tres veces, los cuales se agruparon, se concentraron y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

2.3 Análisis cuantitativo de proteínas por SWATH-MS

2.3.1 Construcción de las bibliotecas espectrales MS/MS

Para obtener una buena representación de los péptidos y proteínas presentes en todas las muestras de los tres grupos de estudio (no fumadores, fumadores y exfumadores), se prepararon viales con "pooles" de cada grupo de muestras utilizando cantidades iguales de cada una de las muestras originales. Los "pooles" (4 µl) se analizaron, mediante un enfoque ADD utilizando micro-LC-MS/MS para obtener la librería necesaria para el análisis SWATH-MS. Posteriormente, los péptidos se inyectaron directamente en un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (time-of-flight, TOF) TripleTOF® 6600 (SCIEX) operado con un sistema ADD.

Las identificaciones de péptidos y proteínas se realizaron utilizando el software ProteinPilot™ 5.0.1. (SCIEX) con una búsqueda de datos utilizando la base UniProt específica para humanos (39) y considerando como válidas solo los péptidos y las proteínas identificadas con un error inferior al 1% (false discovery rate, FDR) (40). Los espectros MS/MS de los péptidos identificados se utilizaron para generar la biblioteca espectral que permitió posteriormente la extracción de picos SWATH utilizando la MicroApp MS/MS^{ALL} 2.0 para el software PeakView® 2.2 (SCIEX). Sólo los péptidos con una puntuación de confianza superior al 99% (obtenida en la búsqueda contra la base de datos de UniProt) se incluyeron en la biblioteca espectral.

2.3.2 Cuantificación relativa

La adquisición de MS se realizó en un sistema TripleTOF® 6600 LC-MS/MS (SCIEX). Las muestras de FCG fueron analizadas haciendo 3 réplicas para cada muestra utilizando los equipos y gradientes descritos previamente en la construcción de la biblioteca espectral, pero en lugar de

un método ADD se utilizó el método de adquisición SWATH-MS. El método consiste en repetir un ciclo de adquisición que realiza 100 escaneos TOF MS/MS que cubren todo el rango de masas entre 400 y 1250 m/z (mass-to-charge ratio) con un escaneo TOF MS previo para cada ciclo.

La extracción de datos específicos a partir de los fragmentos obtenidos con el método SWATH se realizó con el software PeakView[®] 2.2 (SCIEX) utilizando la MicroApp de análisis SWATH 2.0 y la biblioteca espectral creada previamente. Se seleccionaron hasta diez péptidos por proteína y siete fragmentos por péptido en base a la intensidad de la señal. Se efectuó la cuantificación SWATH para todas las proteínas de la biblioteca identificadas por ProteinPilot[™] con un FDR $\leq 1\%$. Las áreas de cada proteína en cada muestra se obtuvieron sumando las áreas de los picos de los diez péptidos y de los siete iones fragmento correspondientes.

Las áreas de pico integradas (archivos mrkvw procesados de PeakView[®]) se exportaron directamente al software MarkerView[™] (SCIEX) para el análisis cuantitativo relativo. La exportación generó tres archivos con la información cuantitativa sobre los iones individuales, la intensidad sumada de los diferentes iones para un péptido en particular y la intensidad sumada de los diferentes péptidos para una proteína en particular. El software MarkerView[™] utiliza algoritmos de procesamiento que encuentran con precisión los picos cromatográficos y espectrales directamente a partir de los datos SWATH en bruto, asegurando que los compuestos idénticos en diferentes muestras se comparen con precisión entre sí. Para controlar la posible pérdida desigual de muestras durante el proceso de preparación de las mismas, se realizó la normalización MLR (Most Likely Ratio) (41). La normalización MLR escala los datos de manera que la relación de intensidad más común entre dos muestras cualquiera sea igual a 1,0 y asume que el número de proteínas que no cambian es mayor que el número que cambia de una manera particular (41).

2.4 Análisis estadístico

2.4.1 Comparación de las características clínicas entre pacientes con periodontitis no fumadores, fumadores y exfumadores

Utilizamos el test Shapiro-Wilks para verificar la distribución de las variables, seleccionándose el test T de Student para las variables de distribución normal y el test U de Mann-Whitney para las de distribución no normal. Los test se emplearon para comparar las variables clínicas cuantitativas entre no fumadores, fumadores y exfumadores. Además, utilizamos el test de Fisher para evaluar la asociación de variables cualitativas entre las tres condiciones clínicas. Se estableció un nivel de significación de $p < 0,05$.

2.4.2 Evaluación de la estructura del proteoma periodontal

Se utilizó el software R (versión 4.2.2) (42) para realizar el análisis estadístico de datos de las muestras de FCG de los tres grupos de estudio (no fumadores, fumadores y exfumadores).

Empleamos el análisis de componentes principales (ACP) para visualizar la agrupación de las muestras de FCG en cada grupo de estudio. Utilizamos el software FactoMineR (versión 2.8) (43) para realizar el ACP y, a continuación, se evaluó el grado de variabilidad dentro de cada componente con el paquete factoextra (versión 1.0.7) (44). Utilizamos el programa informático vegan (versión 2.6.4) (45) para realizar dos evaluaciones: 1) un análisis de las similitudes (ANOSIM) entre los grupos y 2) un análisis de la varianza, utilizando para ello una matriz de similitud mediante la función adonis2 del análisis multivariado permutado de la varianza (PERMANOVA) (46). Se estableció un nivel de significación de $p < 0,05$.

2.4.3 Evaluación de la expresión diferencial de proteínas

Con respecto a todas las proteínas cuantificadas en el FCG, evaluamos la expresión diferencial media entre no fumadores, fumadores y exfumadores. Para ello empleamos el test no paramétrico U de Mann-Whitney. La expresión diferencial se consideró estadísticamente significativa para un valor $p < 0,05$ (valor $p -\log_{10} = 1,3$). Posteriormente, calculamos el tamaño del efecto de cada proteína en todas las fases utilizando el paquete effsize (versión 0.8.1) (47). Para ello utilizamos la d de Cohen, que se basa en la diferencia de medias estandarizada (48). Se considera un tamaño del efecto pequeño con un valor absoluto de 0,2-0,5, mediano entre 0,5-0,8 y grande $>0,8$. Se crearon diagramas de volcán a partir de los valores p y la expresión diferencial del tamaño del efecto. Las proteínas con un valor $p < 0,05$ y un tamaño del efecto $>0,2$ (reguladas al alza) o $<-0,2$ (reguladas a la baja) se consideraron expresadas diferencialmente.

3. Resultados

3.1 Comparación de las características clínicas de pacientes periodontales no fumadores, fumadores y exfumadores

Un total de 40 pacientes con periodontitis (20 hombres y 20 mujeres) fueron seleccionados en el presente estudio, divididos en tres grupos de acuerdo con el hábito tabáquico: 13 no fumadores, 17 fumadores y 10 exfumadores.

Si analizamos las características de los pacientes (sexo, edad y número de dientes en boca), comprobamos que no se muestran diferencias significativas entre los grupos clínicos. Además, entre los fumadores y exfumadores no hubo diferencias significativas entre el número de cigarrillos/día ni el tiempo fumando. Por su parte, si analizamos los parámetros clínicos considerados (NPB, SS, PS y PIC) en toda la boca y en los sitios donde se tomó la muestra, tampoco existen diferencias significativas (Tablas 1A, 1B y 1C).

Tabla 1A. Edad, género, hábito tabáquico y características clínicas de los pacientes periodontales de los que se recogieron muestras de FCG, comparando no fumadores con fumadores.

Características de los pacientes	Grupos de estudio		
	No fumadores (n=13)	Fumadores (n=17)	Valor p
Edad (años)	55,53 (11,41)	51,35 (9,60)	NS (p=0,30)
Género			
Masculino (n°)	7	8	NS (p=1)
Femenino (n°)	6	9	
Hábito tabáquico			
Cigarrillos/día (n°)	NA	15,03 (10,37)	NA
Años fumando (n°)	NA	29,71 (12,48)	NA
N° de dientes	22,38 (4,82)	20 (5,67)	NS (p=0,23)*
Parámetros clínicos			
Boca completa			
NPB (%)	44,38 (27,16)	50,82 (30,38)	NS (p=0,55)
SS (%)	56,00 (20,50)	50,18 (22,40)	NS (p=0,47)
PS (mm)	3,60 (0,66)	3,61 (0,62)	NS (p=0,96)
PIC (mm)	8,15 (1,77)	8,35 (1,94)	NS (p=0,76)
Zonas subgingivales (muestras)			
SS (%)	94,23 (10,96)	85,29 (18,58)	NS (p=0,16)*
PS (mm)	6,14 (0,90)	5,92 (0,58)	NS (p=0,70)
PIC (mm)	6,91 (1,19)	7,08 (1,27)	NS (p=0,97)*

Abreviaturas: FCG: fluido crevicular gingival; mm: milímetros; NA: no aplica; NPB: nivel de placa bacteriana; NS: no significativo; n°: número; PIC: pérdida de inserción clínica; PS: profundidad de sondaje; SS: sangrado al sondaje. *: Test U de Mann-Whitney (variable de distribución no normal). El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$. Los valores representan valores medios (desviación estándar) y número de sujetos.

Tabla 1B. Edad, género, hábito tabáquico y características clínicas de los pacientes periodontales de los que se recogieron muestras de FCG, comparando no fumadores con exfumadores.

Características de los pacientes	Grupos de estudio		
	No fumadores (n=13)	Exfumadores (n=10)	Valor p
Edad (años)	55,53 (11,41)	56,10 (9,56)	NS (p=0,90)
Género			
Masculino (n°)	7	5	NS (p=1)
Femenino (n°)	6	5	
N° de dientes	22,38 (4,82)	22,3 (3,53)	NS (p=0,64)*
Años sin fumar	NA	7,50 (6,10)	NA
Parámetros clínicos			
Boca completa			
NPB (%)	44,38 (27,16)	59,90 (22,32)	NS (p=0,15)
SS (%)	56,00 (20,50)	45,50 (10,55)	NS (p=0,13)
PS (mm)	3,60 (0,66)	3,59 (0,45)	NS (p=0,97)
PIC (mm)	8,15 (1,77)	8,08 (1,38)	NS (p=0,92)
Zonas subgingivales (muestras)			
SS (%)	94,23 (10,96)	81,50 (17,00)	NS (p=0,06)*
PS (mm)	6,14 (0,90)	6,29 (0,83)	NS (p=0,70)
PIC (mm)	6,91 (1,19)	7,33 (1,39)	NS (p=0,45)

Abreviaturas: FCG: fluido crevicular gingival; mm: milímetros; NA: no aplica; NPB: nivel de placa bacteriana; NS: no significativo; n°: número; PIC: pérdida de inserción clínica; PS: profundidad de sondaje; SS: sangrado al sondaje. *: Test U de Mann-Whitney (variable de distribución no normal). El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$. Los valores representan valores medios (desviación estándar) y número de sujetos.

Tabla 1C. Edad, género, hábito tabáquico y características clínicas de los pacientes periodontales de los que se recogieron muestras de FCG, comparando exfumadores con fumadores.

Características de los pacientes	Grupos de estudio		
	Exfumadores (n=10)	Fumadores (n=17)	Valor p
Edad (años)	56,10 (9,56)	51,35 (9,60)	NS (p=0,23)
Género			
Masculino (n°)	5	8	NS (p=1)
Femenino (n°)	5	9	
Hábito tabáquico			
Cigarrillos/día (n°)	20,00 (10,34)	15,03 (10,37)	NS (p=0,24)
Años fumando (n°)	27,50 (7,65)	29,71 (12,48)	NS (p=0,57)
Años sin fumar (n°)	7,50 (6,10)	NA	NA
N° de dientes	22,30 (3,53)	20,00 (5,67)	NS (p=0,21)
Parámetros clínicos			
Boca completa			
NPB (%)	59,90 (22,32)	50,82 (30,38)	NS (p=0,38)
SS (%)	45,50 (10,55)	50,18 (22,40)	NS (p=0,47)
PS (mm)	3,59 (0,45)	3,61 (0,62)	NS (p=0,92)
PIC (mm)	8,08 (1,38)	8,35 (1,94)	NS (p=0,67)
Sitios de las muestras			
SS (%)	81,50 (17,00)	85,29 (18,58)	NS (p=0,60)*
PS (mm)	6,29 (0,83)	5,92 (0,58)	NS (p=0,24)
PIC (mm)	7,33 (1,39)	7,08 (1,27)	NS (p=0,69)*

Abreviaturas: FCG: fluido crevicular gingival; mm: milímetros; NA: no aplica; NPB: nivel de placa bacteriana; NS: no significativo; n°: número; PIC: pérdida de inserción clínica; PS: profundidad de sondaje; SS: sangrado al sondaje. *: Test U de Mann-Whitney (variable de distribución no normal). El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$. Los valores representan valores medios (desviación estándar) y número de sujetos.

3.2 Estructura del proteoma periodontal en FCG

El análisis SWATH-MS nos permitió cuantificar un total de 250 proteínas en las muestras de FCG para los tres grupos clínicos. En primer lugar, evaluamos la estructura del proteoma en FCG usando un ACP. Las dos primeras dimensiones corresponden al 44,4% del total de la varianza (Figura 1).

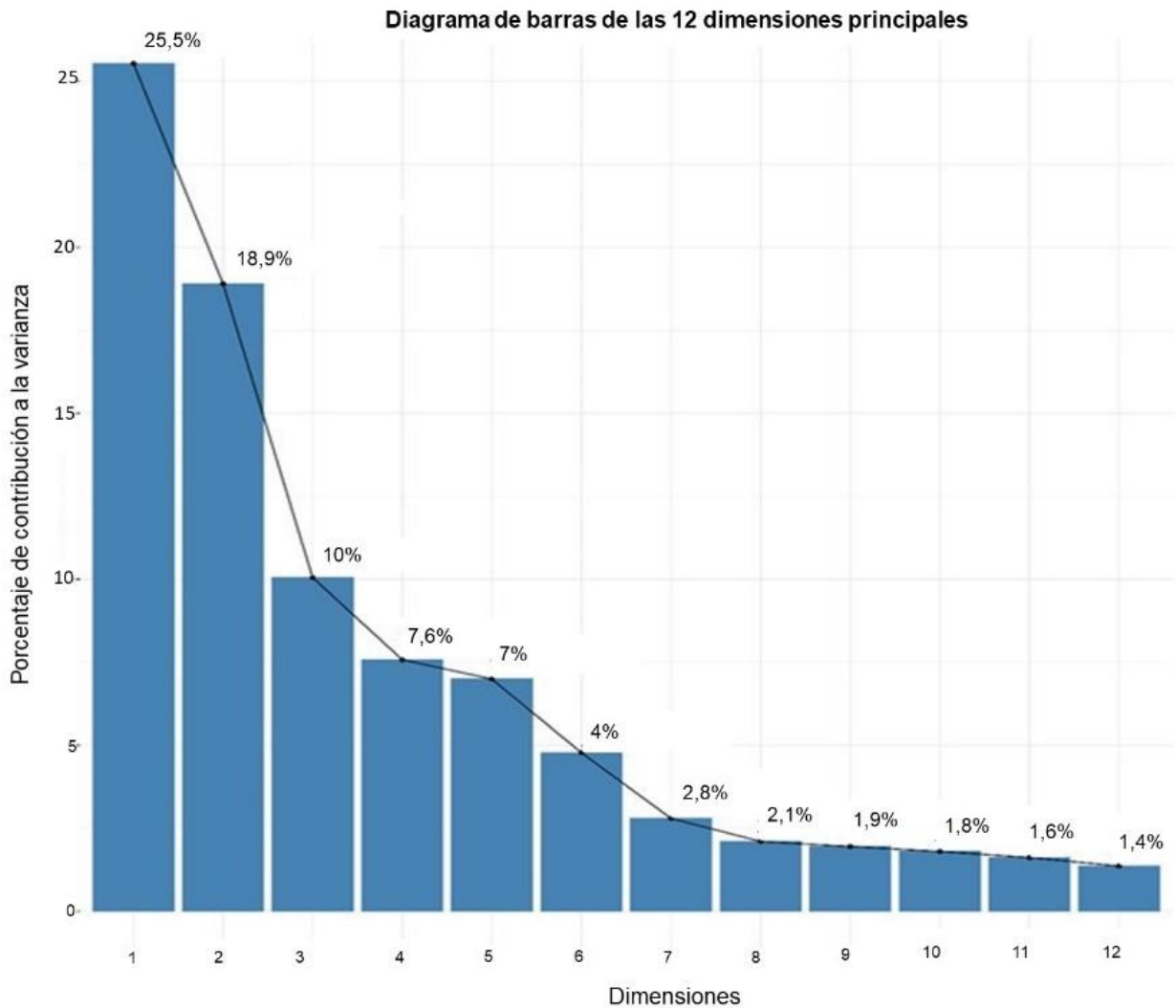


Figura 1. Valor propio del porcentaje de variabilidad dentro de cada dimensión en las muestras del FCG.

El gráfico ACP mostró una agrupación de las muestras del FCG de acuerdo con el hábito tabáquico. Se puede observar un gran grado de solapamiento entre las muestras de fumadores y exfumadores, siendo ligeramente diferente en no fumadores (Figuras 2A y 2B). Sin embargo, los test ANOSIM y adonis2 demostraron que las diferencias no fueron significativas en la estructura del proteoma periodontal en FCG entre los tres grupos clínicos (Tabla 2).

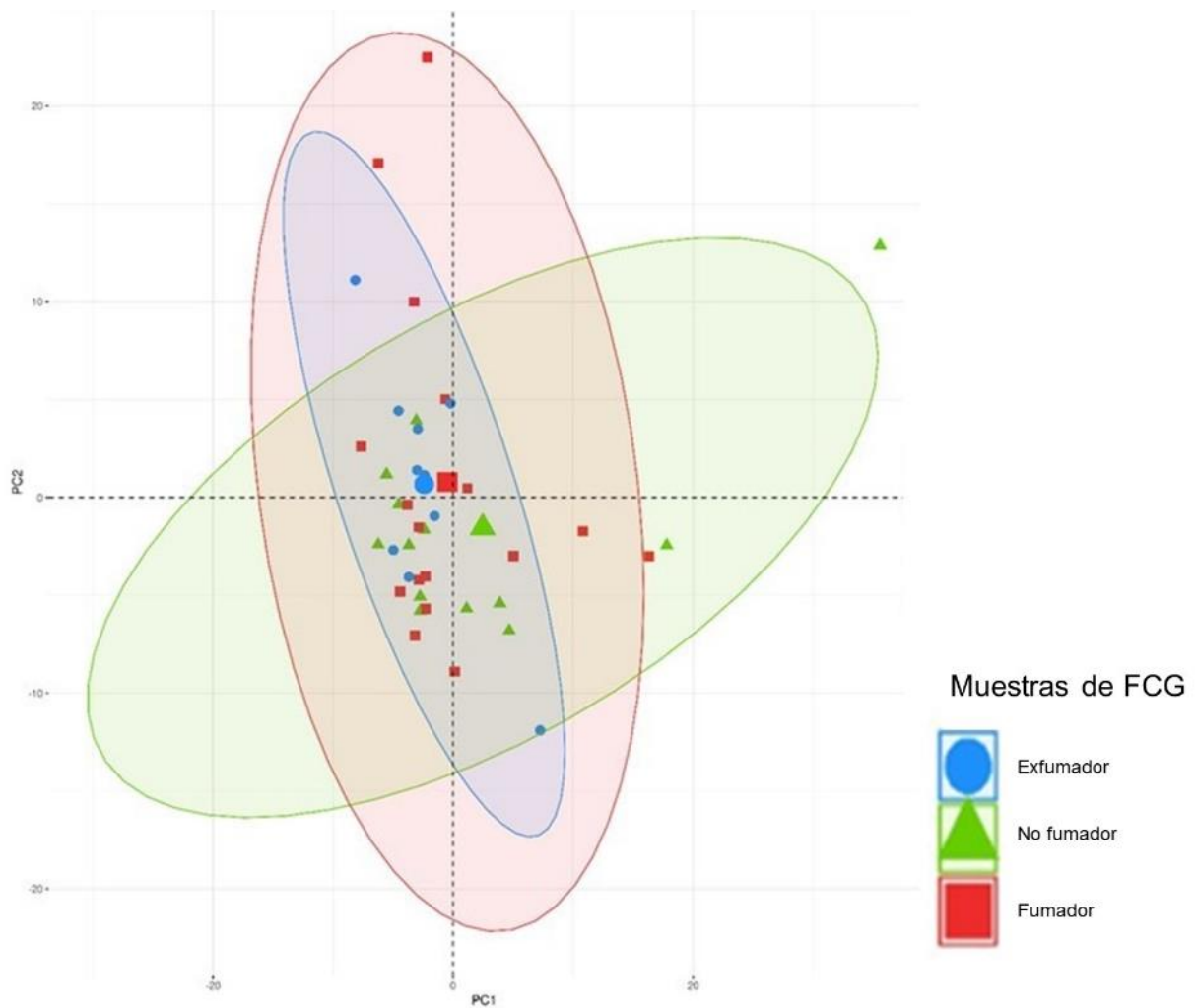


Figura 2A. ACP de las muestras de FCG según el grupo clínico: no fumador (verde), fumador (rojo) y exfumador (azul). Se muestran los centroides de cada grupo clínico y sus correspondientes rangos de valores.

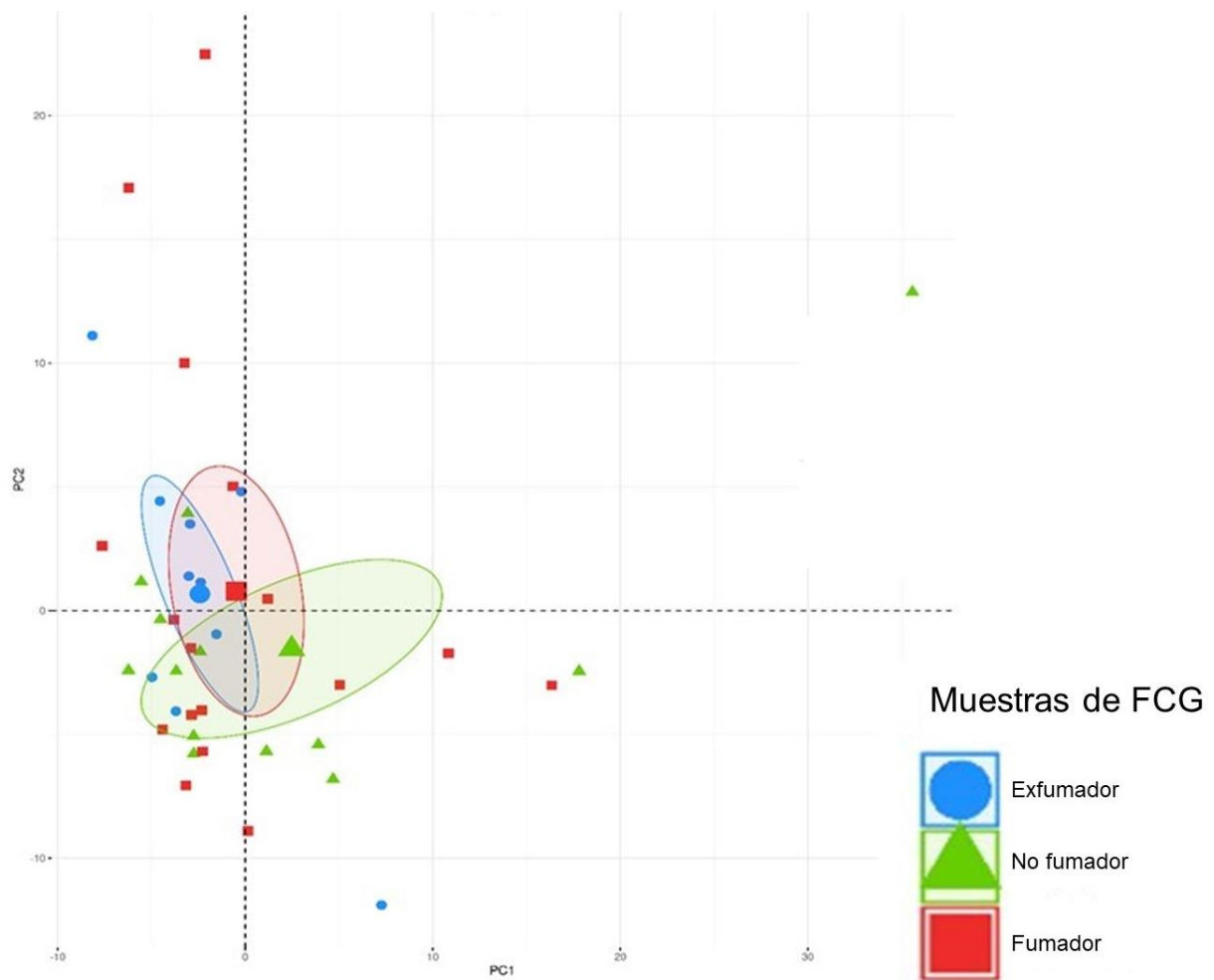


Figura 2B. ACP de las muestras de FCG según el grupo clínico: no fumador (verde), fumador (rojo) y exfumador (azul). Se muestran los centroides de cada grupo clínico y sus correspondientes intervalos de confianza del 95%.

Tabla 2. Valores de los tests ANOSIM y adonis2 de las proteínas del FCG en los diferentes grupos clínicos.

Condición objetivo	Condición control	Valor p en ANOSIM	Valor p en adonis2
No fumador	Fumador	0,801	0,369
No fumador	Exfumador	0,133	0,082
Exfumador	Fumador	0,427	0,371

Abreviaturas: ANOSIM: análisis de similitudes.
El nivel de significación se estableció en $p < 0,05$

3.3 Expresión diferencial de las proteínas cuantificadas en FCG

Considerando la expresión de las 250 proteínas del FCG cuantificadas, se observó que 23 (9,2%) se expresaban de forma diferencial (valor $p < 0,05$; tamaño del efecto absoluto $> 0,2$) en las muestras de no fumadores en comparación con los fumadores. De ellas, 16 (69,6%) estaban reguladas a la baja y siete (30,4%) al alza. Comparando a los no fumadores con los exfumadores, 17 proteínas (6,8%) se expresaron de forma diferencial, de las cuales 15 fueron reguladas al alza (88,2%) y dos a la baja (11,8%). En las muestras de exfumadores en comparación con fumadores, ocho proteínas (3,2%) se expresaron de forma diferencial, con siete (87,5%) reguladas al alza y una a la baja (12,5%) (Figura 3).

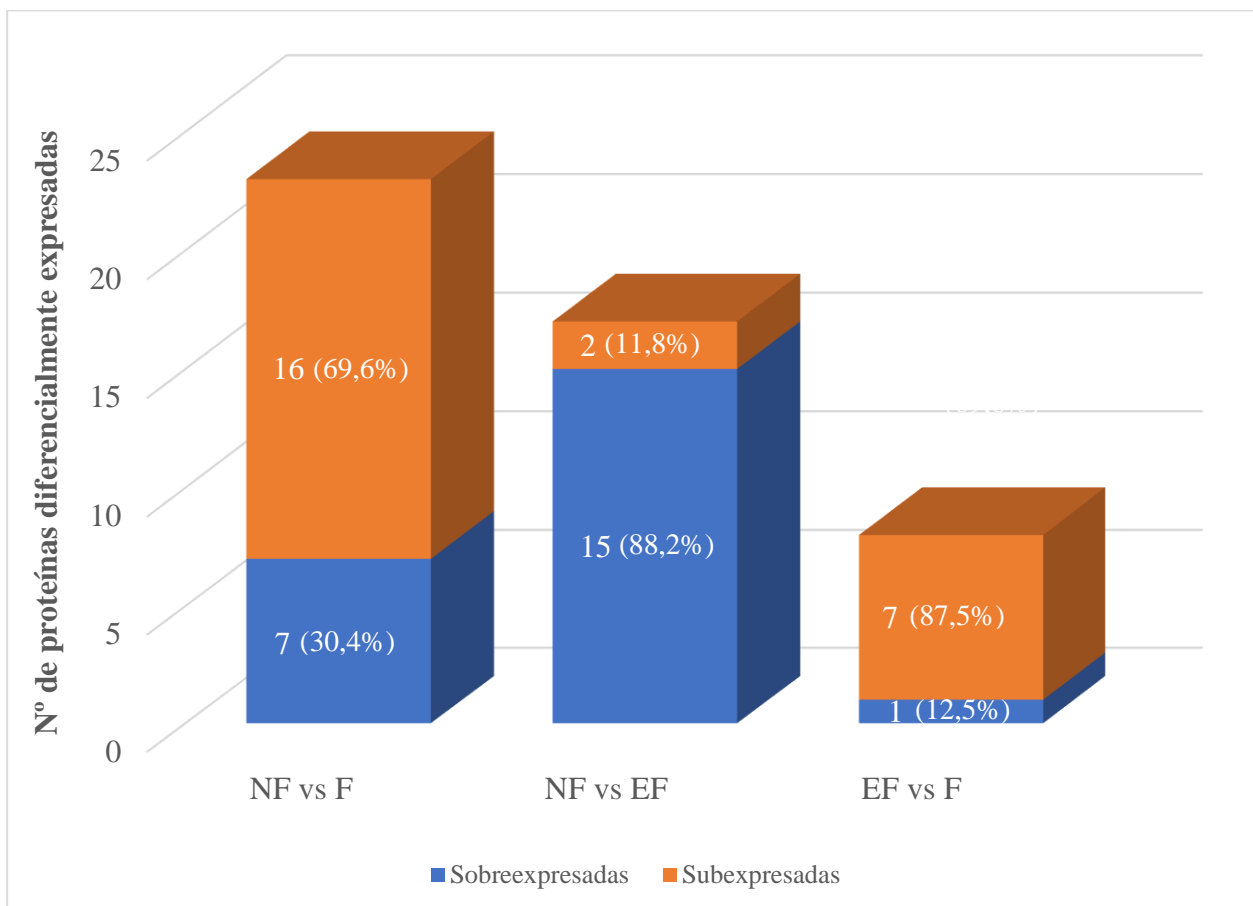


Figura 3. Número de proteínas (porcentajes) del FCG sobreexpresadas y subexpresadas en cada grupo clínico.

Abreviaturas: EF: exfumador; F: fumador; n°: número; NF: no fumador; vs: versus.

Se consideraron proteínas diferencialmente expresadas para un valor $p < 0,05$ y tamaño del efecto $> 0,2$ (sobreexpresada) o $< -0,2$ (subexpresada).

3.3.1 Grupo de no fumadores comparado con grupo de fumadores

Si nos centramos en las siete proteínas reguladas al alza en los pacientes no fumadores en comparación con los fumadores, dos mostraron un tamaño del efecto grande (0,85 en ambas) y cinco un tamaño del efecto mediano (0,64 – 0,79) (Tabla 3 y Figura 4). Dichas proteínas reguladas al alza con un tamaño del efecto grande fueron la elastasa neutrofílica (0,85) y olfactomedina-4 (0,85).

Tabla 3. Proteínas del FCG sobreexpresadas en no fumadores en comparación con fumadores (N=7).

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Fold-change	Valor p	Tamaño del efecto (DE)	Mag.
P08246	Elastasa neutrofílica	1,56	0,0364	0,85 (26603,92)	Grande (N=2)
Q6UX06	Olfactomedina-4	1,40	0,0400	0,85 (389,87)	
A0A0C4DH68	Ig kappa variable 2-24	2,13	0,0238	0,79 (3999,74)	Mediano (N=5)
P02671	Cadena alfa del fibrinógeno	1,64	0,0445	0,77 (14753,78)	
P35754	Glutarredoxina-1	1,41	0,0492	0,74 (391,95)	
P01859	Ig gamma 2 constante pesada	1,66	0,0492	0,68 (76718,88)	
P01876	Ig alfa 1 constante pesada	1,54	0,0295	0,64 (57833,75)	

Abreviaturas: DE: desviación estándar; Ig: inmunoglobulina; Mag.: magnitud del tamaño del efecto. Se consideraron proteínas diferencialmente expresadas para un valor p <0,05 y tamaño del efecto >0,2. Magnitud del tamaño del efecto: mediano (morado): 0.5 – 0.8; grande (rojo): >0.8.

Por su parte, si analizamos las 16 proteínas reguladas a la baja, cinco obtuvieron un tamaño del efecto grande (-0,83 – -1,24) y 11 un tamaño del efecto pequeño-mediano (-0,24 – -0,79) (Tabla 4 y Figura 5). Dichas proteínas subexpresadas con un tamaño del efecto grande corresponden de menor a mayor con: proteína 5 de unión a ácidos grasos (-1,24), cornulina (-0,98), proteína-glutamina gamma-glutamyltransferasa E (-0,95), factor de elongación 1-gamma (-0,85) y chaperona del retículo endoplásmico proteína de unión a inmunoglobulina (binding immunoglobulin protein, BiP) (-0,83) (Tabla 4).

Tabla 4. Proteínas del FCG subexpresadas en no fumadores en comparación con fumadores (N=16).

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Fold-change	Valor p	Tamaño del efecto (DE)	Mag.
Q01469	Proteína 5 de unión a ácidos grasos	0,48	0,0107	-1,24 (19946,93)	Grande (N=5)
Q9UBG3	Cornulina	0,38	0,0023	-0,98 (2250,69)	
Q08188	Proteína-glutamina gamma-glutamyltransferasa E	0,51	0,0402	-0,95 (7649,03)	
P26641	Factor de elongación 1-gamma	0,69	0,0238	-0,85 (1208,39)	
P11021	Chaperona del retículo endoplásmico BiP	0,73	0,0265	-0,83 (1360,66)	
P19013	Queratina, tipo II citoesquelética 4	0,16	0,0120	-0,79 (88171,39)	Pequeño-Mediano (N=11)
P04080	Cistatina-B	0,56	0,0190	-0,79 (13577,58)	
P02545	Prelamina-A/C	0,62	0,0328	-0,77 (846,69)	
P07900	Proteína de choque térmico HSP 90-alfa	0,63	0,0491	-0,76 (1364,90)	
P13646	Queratina, tipo I citoesquelética 13	0,23	0,0363	-0,73 (386694,53)	
Q06830	Peroxirredoxina-1	0,67	0,0445	-0,70 (23707,55)	
P14550	Familia 1 de la aldo-ceto reductasa, miembro A1	0,66	0,0445	-0,68 (930,83)	
P22314	Enzima activadora de modificadores similares a la ubiquitina 1	0,69	0,0328	-0,65 (385,86)	
P29508	Serpina B3	0,69	0,0363	-0,61 (16388,59)	
P08727	Queratina, tipo I citoesquelética 19	0,62	0,0492	-0,47 (3072,08)	
P17931	Galectina-3	0,81	0,0171	-0,24 (834,27)	

Abreviaturas: BiP: proteína de unión a inmunoglobulina (binding immunoglobulin protein); DE: desviación estándar; Mag.: magnitud del tamaño del efecto; Ig: inmunoglobulina.

Se consideraron proteínas diferencialmente expresadas para un valor p <0,05 y tamaño del efecto <-0,2.

Magnitud del tamaño del efecto: pequeño-mediano (azul): -0.5 – -0.8; grande (verde): <-0.8.

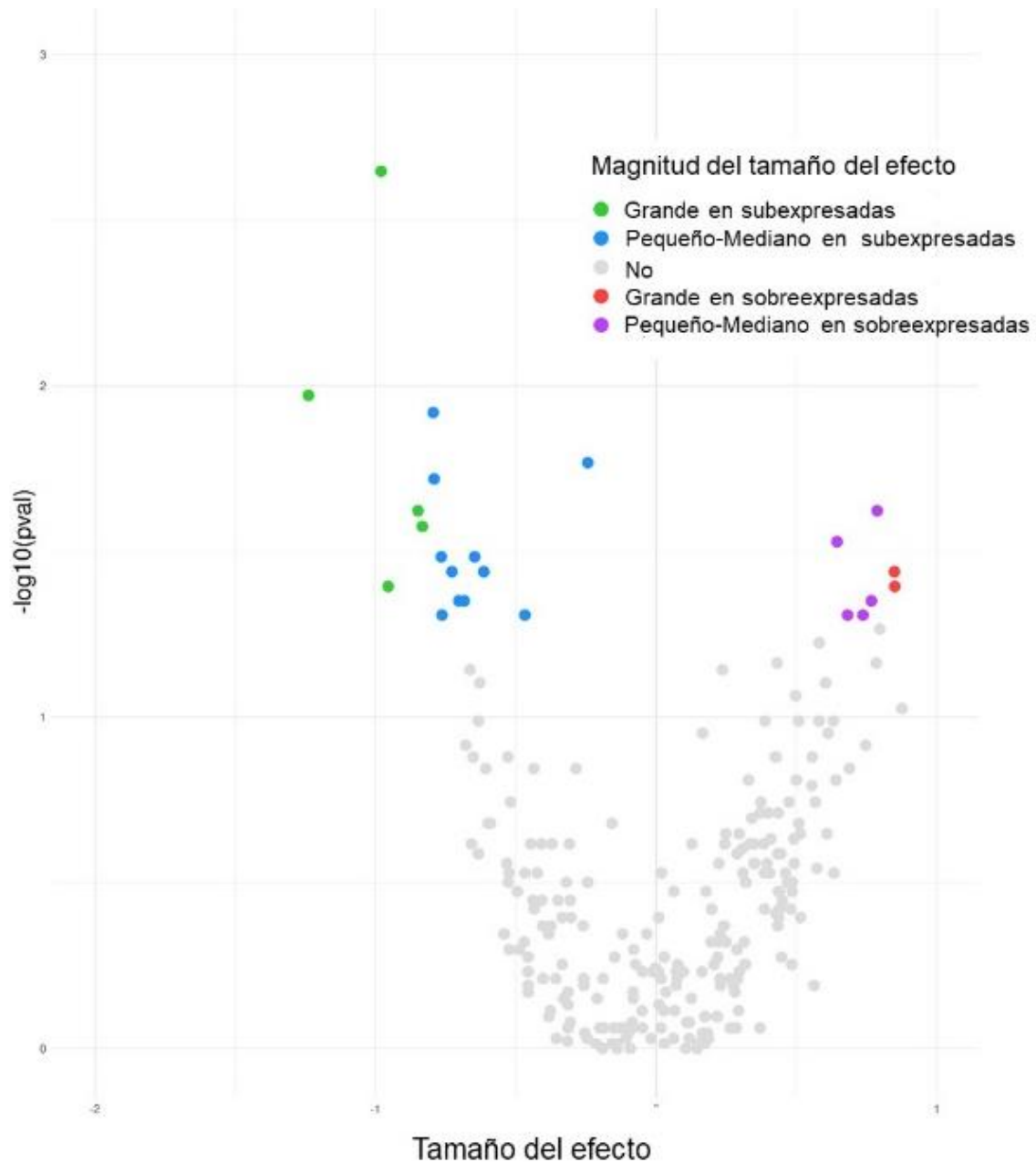


Figura 4. Diagrama de volcán de las proteínas del FCG sobreexpresadas (N= 7; 2 de tamaño de efecto grande y 5 mediano) y subexpresadas (N= 16; 5 de tamaño de efecto grande y 11 pequeño-mediano) en no fumadores en comparación con fumadores.

Se consideraron proteínas diferencialmente expresadas para un valor $p < 0,05$ y tamaño del efecto $> 0,2$ (sobreexpresada) o $< -0,2$ (subexpresada).

Magnitud del tamaño del efecto: pequeño-mediano subexpresado (azul): $-0,2 - -0,8$; grande subexpresado (verde): $< -0,8$; pequeño-mediano sobreexpresado (morado): $0,2 - 0,8$; grande sobreexpresado (rojo): $> 0,8$.

3.3.2 Grupo de no fumadores comparado con grupo de exfumadores

Tabla 5. Proteínas del FCG expresadas diferencialmente en no fumadores con respecto a exfumadores (sobreexpresadas: N=15; subexpresadas: N=2).

PROTEÍNAS SOBREEXPRESADAS					
Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Fold-change	Valor p	Tamaño del efecto (DE)	Mag.
P01876	Ig alfa 1 constante pesada	2,29	0,0048	1,26 (48798,75)	Grande (N=8)
P01023	Alfa-2-macroglobulina	1,72	0,0083	1,20 (78795,96)	
P01624	Ig kappa variable 3-15	2,64	0,0377	0,89 (1902,74)	
P01714	Ig lambda variable 3-19	1,69	0,0377	0,87 (2933,40)	
P02763	Alfa-1-glicoproteína ácida 1	2,16	0,0377	0,84 (20842,56)	
P01742	Ig pesada variable 1-69	1,84	0,0120	0,83 (3688,22)	
P01011	Alfa-1-antiquimotripsina	1,58	0,0377	0,81 (53669,43)	
A0A0C4DH68	Ig kappa variable 2-24	2,44	0,0236	0,80 (4362,18)	
PROTEÍNAS SUBEXPRESADAS					
P69892	Subunidad gamma-2 de la Hb	3,08	0,0438	0,76 (14825,82)	Mediano (N=7)
P02749	Beta-2-glicoproteína 1	2,21	0,0170	0,71 (18885,15)	
P02774	Proteína de unión a la vitamina D	2,01	0,0377	0,64 (86354,25)	
P02768	Albúmina	2,24	0,0236	0,62 (28297838,10)	
P02765	Alfa-2-HS-glicoproteína	1,58	0,0200	0,58 (12922,53)	
Q14624	Inhibidor inter-alfa-tripsina de cadena pesada H4	1,64	0,0377	0,55 (7328,19)	
P00747	Plasminógeno	1,73	0,0438	0,54 (1496,90)	
PROTEÍNAS SUBEXPRESADAS					
Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Fold-change	Valor p	Tamaño del efecto (DE)	Mag.
P00558	Fosfoglicerato quinasa 1	0,46	0,0438	-0,92 (2083,45)	Grande (N=2)
P63104	Proteína 14-3-3 zeta/delta	0,79	0,0277	-0,90 (7273,59)	

Abreviaturas: DE: desviación estándar; Hb: hemoglobina; Ig: inmunoglobulina; Mag.: magnitud del tamaño del efecto.

Se consideraron proteínas diferencialmente expresadas para un valor p <0,05 y tamaño del efecto >0,2 (sobreexpresada) o <-0,2 (subexpresada).

Magnitud del tamaño del efecto: mediano sobreexpresado (morado): 0.5 – 0.8; grande sobreexpresado (rojo): >0.8; grande subexpresado (verde): <-0,8.

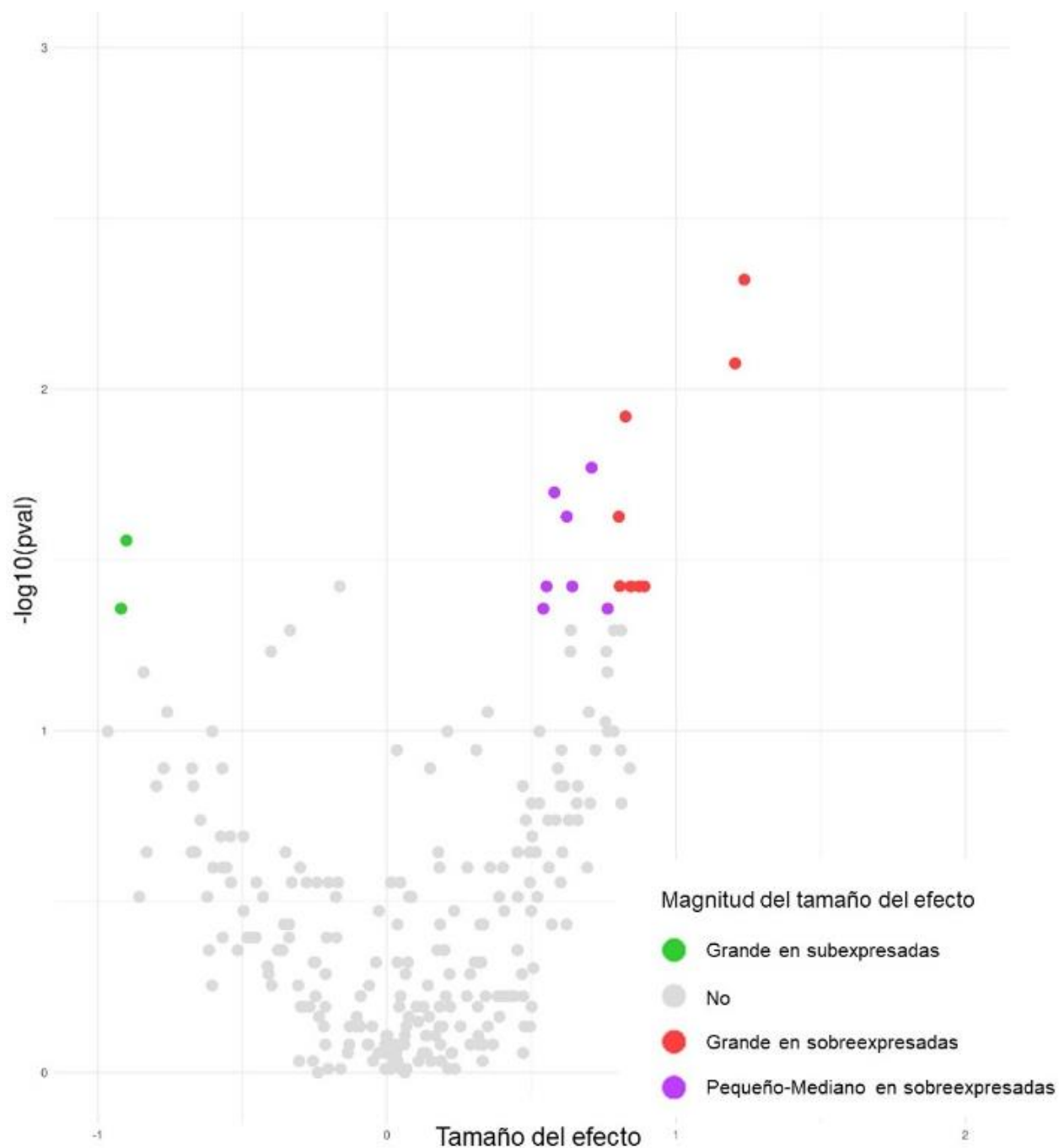


Figura 5. Diagrama de volcán de las proteínas del FCG sobreexpresadas (N= 15; 8 de tamaño de efecto grande y 7 mediano) y subexpresadas (N= 2 con tamaño de efecto grande) en no fumadores en comparación con exfumadores.

Se consideraron proteínas diferencialmente expresadas para un valor $p < 0,05$ y tamaño del efecto $> 0,2$ (sobreexpresada) o $< -0,2$ (subexpresada).

Magnitud del tamaño del efecto: grande subexpresado (verde): $< -0,8$; pequeño-mediano sobreexpresado (morado): $0,2 - 0,8$; grande sobreexpresado (rojo): $> 0,8$.

Si consideramos las proteínas diferencialmente expresadas en no fumadores con respecto a exfumadores, comprobamos que 15 estuvieron reguladas al alza, donde ocho presentaron un tamaño del efecto grande (0,80 – 1,26) y siete un tamaño del efecto mediano (0,54 – 0,76) (Tabla 5 y Figura 5). Las proteínas más diferencialmente expresadas fueron (de mayor a menor): inmunoglobulina (Ig) alfa 1 pesada constante (1,26), alfa-2-macroglobulina (1,20), Ig kappa variable 3-15 (0,89), Ig lambda variable 3-19 (0,87), alfa-1-glicoproteína ácida 1 (0,84), Ig variable pesada 1-69 (0,83), alfa-1-antiquimotripsina (0,81) e Ig kappa variable 2-24 (0,80). Por otra parte, las proteínas reguladas a la baja de forma significativa fueron dos, ambas con tamaño del efecto grande: fosfoglicerato quinasa 1 (-0,92) y proteína 14-3-3 zeta/delta (-0,90) (Tabla 5 y Figura 5).

3.3.3 Grupo de exfumadores comparado con grupo de fumadores

Tabla 6. Proteínas del FCG expresadas diferencialmente en exfumadores con respecto a fumadores (sobrexpresadas: N=1; subexpresadas: N=7).

PROTEÍNAS SOBREEXPRESADAS					
Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Fold-change	Valor p	Tamaño del efecto (DE)	Mag.
P07737	Profilina-1	1,54	0,0149	1,07 (17473,45)	G (N=1)
PROTEÍNAS SUBEXPRESADAS					
Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Fold-change	Valor p	Tamaño del efecto (DE)	Mag.
P11021	Chaperona del retículo endoplásmico BiP	0,69	0,0196	-0,95 (1409,19)	Grande (N=2)
P02763	Alfa-1-glicoproteína ácida 1	0,57	0,0420	-0,87 (13279,60)	
O43707	Alfa-actinina-4	0,79	0,0420	-0,78 (3197,76)	Mediano (N=5)
P01011	Alfa-1-antiquimotripsina	0,68	0,0328	-0,74 (47135,15)	
P19013	Queratina, tipo II citoesquelética 4	0,21	0,0171	-0,71 (93538,58)	
P0DOX5	Cadena pesada de Ig gamma	0,59	0,0255	-0,66 (316983,71)	
P69892	Subunidad gamma 2 de la Hb	0,42	0,0328	-0,53 (14437,30)	

Abreviaturas: BiP: proteína de unión a inmunoglobulina (binding immunoglobulin protein); DE: desviación estándar; G: grande; Hb: hemoglobina; Ig: inmunoglobulina; Mag.: magnitud del tamaño del efecto.

Se consideraron proteínas diferencialmente expresadas para un valor p <0,05 y tamaño del efecto >0,2 (sobrexpresada) o <-0,2 (subexpresada).

Magnitud del tamaño del efecto: grande sobreexpresado (rojo): >0,8; grande subexpresado (verde): <-0,8; mediano subexpresado (azul): -0,5 – -0,8.

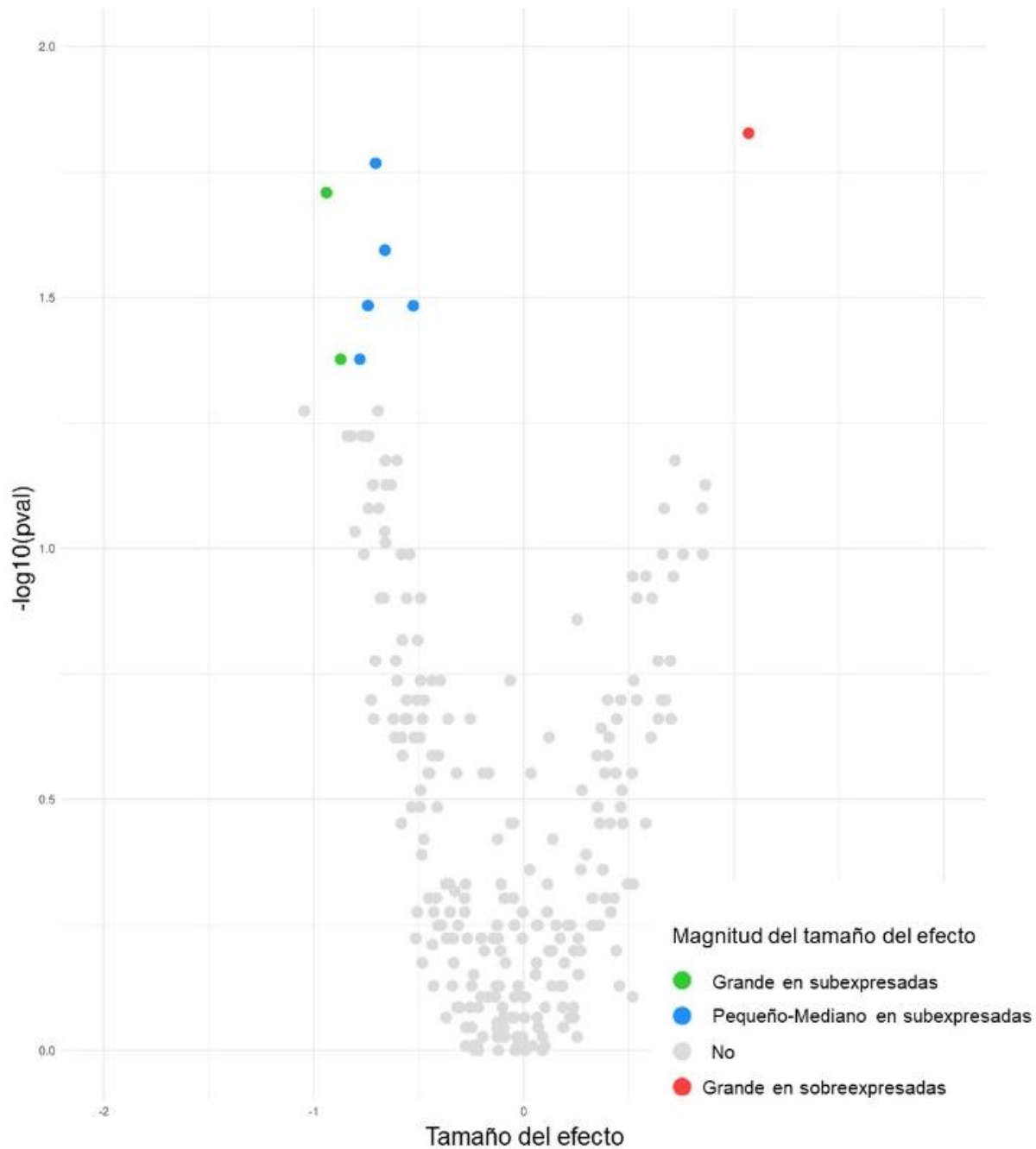


Figura 6. Diagrama de volcán de las proteínas del FCG sobreexpresadas (N= 1 con tamaño de efecto grande) y subexpresadas (N= 7; 2 de tamaño de efecto grande y 5 mediano) en exfumadores en comparación con fumadores.

Se consideraron proteínas diferencialmente expresadas para un valor $p < 0,05$ y tamaño del efecto $> 0,2$ (sobreexpresada) o $< -0,2$ (subexpresada).

Magnitud del tamaño del efecto: pequeño-mediano subexpresado (azul): $-0,2 - -0,8$; grande subexpresado (verde): $< -0,8$; pequeño-mediano sobreexpresado (morado): $0,2 - 0,8$; grande sobreexpresado (rojo): $> 0,8$.

Si nos centramos en las proteínas diferencialmente expresadas en exfumadores con respecto a fumadores, tan solo una estuvo regulada al alza y con un tamaño del efecto grande (1,07), correspondiendo a la profilina 1 (Tabla 6 y Figura 6). Con respecto a las siete proteínas subexpresadas, dos presentaron un tamaño del efecto grande (-0,87 – -0,95) y cinco un tamaño del efecto mediano (-0,53 – -0,78) (Tabla 6 y Figura 6). Dichas dos proteínas con tamaño del efecto grande corresponden a chaperona del retículo endoplásmico BiP (-0,95) y alfa-1-glicoproteína ácida 1 (-0,87).

3.3.4 Comparación de los resultados obtenidos en los tres grupos clínicos

Si comparamos los resultados observados en los tres grupos clínicos evaluados, chaperona del retículo endoplásmico BiP y queratina, tipo II citoesquelética 4 demostraron estar subexpresadas en no fumadores y exfumadores comparado con el grupo de fumadores. La primera demostró un tamaño del efecto grande en ambas comparativas (no fumadores vs fumadores: -0,83; exfumadores vs fumadores: -0,95), mientras que en la segunda fue mediano (-0,79 y -0,71, respectivamente).

Contrariamente, las Ig alfa 1 constante pesada y kappa variable 2-24 fueron halladas reguladas al alza en no fumadores con respecto a los fumadores y a los exfumadores. Ig alfa 1 constante pesada mostró un tamaño del efecto mediano comparado con los fumadores (0,64) y grande comparado con los exfumadores (1,26), mientras que Ig kappa variable 2-24 presentó un tamaño del efecto muy similar en ambas comparativas (0,79 y 0,80, respectivamente).

Por otro lado, alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-glicoproteína ácida 1 y la subunidad gamma-2 de la hemoglobina (Hb) mostraron estar sobreexpresadas en no fumadores comparado con los exfumadores, mientras que en los exfumadores con respecto a los fumadores demostraron estar infraexpresadas. Alfa-1-antiquimotripsina presentó un tamaño del efecto grande en la primera comparativa, pero mediano en la segunda (no fumadores vs exfumadores: 0,81; exfumadores vs fumadores: -0,74); en la alfa-1-glicoproteína ácida 1, el tamaño del efecto fue grande en ambos grupos clínicos (0,84 y -0,87, respectivamente), mientras que en la subunidad gamma-2 de la Hb el tamaño del efecto fue mediano en las dos comparativas (0,76 y -0,53, respectivamente).

4. Discusión

El análisis de muestras de FCG recogidas de pacientes con periodontitis no fumadores, fumadores y exfumadores mediante la técnica proteómica SWATH-MS, permitió la cuantificación de un total de 250 proteínas. La condición tabáquica no supuso un cambio significativo en la estructura del proteoma periodontal. Sin embargo, diversas proteínas demostraron estar diferencialmente expresadas de acuerdo con el hábito tabáquico.

4.1 Técnica SWATH-MS para el análisis del proteoma periodontal

Durante los últimos años, las técnicas proteómicas de alto rendimiento y, en concreto, la MS, se ha convertido en una valiosa herramienta para el análisis del proteoma periodontal, ya que permite identificar prácticamente todas las proteínas sin limitaciones de sensibilidad o especificidad, como también la cuantificación de un gran número de proteínas al mismo tiempo (49).

El proteoma periodontal del FCG ha sido analizado mediante técnicas de etiquetado (“label”) (50-52) y sin etiquetado (“label-free”) (30, 53, 54). Sin embargo, a día de hoy se opta más por los enfoques sin etiquetado, como SWATH-MS, puesto que son menos susceptibles a errores técnicos, más rentables, requieren menos tiempo y son muy sensibles, lo que permite la identificación de un gran número de proteínas (55).

En cuanto a las estrategias de adquisición de datos, la técnica de cuantificación dirigida SRM ha sido utilizada para estudiar el proteoma periodontal (56) y para validar los resultados obtenidos con la técnica sin etiquetado (57). Teniendo en cuenta las técnicas DIA no dirigidas, MS^E ha demostrado ser útil para la identificación de proteínas en FCG diferencialmente expresadas en periodontitis (53). La principal ventaja de SWATH-MS sobre otros métodos DIA no dirigidos es que combina la obtención dirigida de datos de archivos DIA de proteínas previamente identificadas, lo que parece ser una adaptación de metodologías dirigidas como SRM, con un análisis de masas de mayor resolución para una cuantificación más precisa de las proteínas (58). Esto mejora la calidad cuantitativa en comparación con otros métodos no dirigidos (23).

4.2 Evidencia sobre el impacto del hábito tabáquico sobre el proteoma periodontal

El tabaco es considerado uno de los factores de riesgo más relevantes tanto en el desarrollo de la periodontitis (15), como en su progresión, tal como se recoge en la Clasificación de enfermedades y afecciones periodontales publicada en 2018 (34). Además, diversos estudios han demostrado que esta condición influye directamente en la expresión de ciertas proteínas en los fluidos orales (20, 59) e incluso impacta en la precisión diagnóstica para detectar la periodontitis (60-62). Sin embargo, la evidencia sobre la influencia de esta variable sobre el proteoma periodontal ha sido escasamente estudiada hasta el momento. Así, en la literatura, hasta donde hemos podido comprobar, solo se han publicado dos estudios que analicen el proteoma periodontal en pacientes fumadores con periodontitis (Tabla 7).

Tabla 7. Características y principales hallazgos de los estudios previos que analizaron el proteoma periodontal de fumadores y no fumadores mediante técnicas proteómicas.

Autor (año)	Stein et al. (2006) (31)	Grant et al. (2019) (32)
Tipo de muestra	FCG	Saliva
Técnica proteómica	SELDI-TOF-MS	SRM-MS
Nº Sujetos	PC_NF: 8 y PC_F: 8	S_NF: 11, S_F: 11, P_NF: 10, P_F: 9
Criterio NF	No consumo previos 10 años	No hay ni hubo consumo
Criterio F	≥10 cigarrillos/día ≥5 años	Consumo actual
Tiempo fumando	Media 13,2 ± 3,7 años (rango 8-18 años)	NE
Nº proteínas	NA	Identificadas: 117. Cuantificadas: 63
Nº proteínas sólo en F	7 picos sólo identificados en PC_F	NA
Hallazgos principales	Huellas espectrales significativamente distintas F vs NF, no relacionado con profundidad de la bolsa. ⇒ 7 picos sólo detectados en F ⇒ 3 picos subexpresados en F. Pueden ser HNP1, HNP2 y HNP3 (familia de alfa-defensinas). Hipótesis: disminución de estos péptidos podría aumentar el riesgo de P en fumadores.	⇒ S_NF vs P_NF (sobreexpresadas, fold change: 19,3-2,1): ribonucleasa 7, protaquinina 1, β-defensina 128, lipocalina 1, BPIB3, proteoglicano de la médula ósea. ⇒ S_NF vs P_NF (subexpresadas, fold change: 0,3-0,45): defensina neutrofílica 1, catelicidina ⇒ S_F vs P_F (sobreexpresadas, fold change: 2-2,6): adrenomedulina, peroxidasa eosinofílica, histonas H2A tipo 2A, H2B tipo 2E y tipo F-S, mieloperoxidasa, defensina neutrofílica 1 ⇒ S_F vs S_NF : NS

Abreviaturas: BPIB3: bactericidal/permeability- increasing fold-containing family B member 3; F: fumador; FCG: fluido crevicular gingival; HNP: defensina natural de neutrófilos humanos (natural human neutrophil defensin); MS: mass-spectrometry; NA: no aplica; NE: no especificado; NF: no fumador; NS: no significativo; nº: número; PC: periodontitis crónica; S: sanos periodontalmente; SELDI-TOF: surface enhanced laser desorption/ionization-Time of flight; SRM: selected reaction monitoring; vs: versus.

Por una parte, el estudio realizado por Stein et al. en 2006 (31) es el único que hasta el momento analizó el impacto del consumo de tabaco en el proteoma del FCG, utilizando como técnica proteómica SELDI (surface-enhanced laser desorption/ionization) TOF-MS. Aunque en este estudio no se identificó ninguna proteína, el patrón de picos en los mapas de MS fue

claramente distinto en fumadores en comparación con no fumadores, detectándose siete picos sólo en fumadores y tres subexpresados en este grupo. Los tres picos subexpresados en fumadores es posible que representen a las defensinas 1-3 natural de los neutrófilos humanos, las cuales pertenecen a la familia de las alfa-defensinas. Por tanto, su disminución podría aumentar el riesgo de periodontitis en fumadores y concluyen que el perfil proteómico de FCG de los fumadores puede servir como fuente de biomarcadores para esta población de alto riesgo (Tabla 7). Con todo, este estudio fue realizado en 2006 y desde entonces las técnicas proteómicas han avanzado mucho, lo que permite un estudio más exhaustivo y preciso del proteoma periodontal.

Por otra parte, Grant et al. (32) más recientemente investigaron las diferencias en el proteoma salival existentes entre pacientes sanos fumadores y no fumadores comparados con pacientes con periodontitis fumadores y no fumadores. Emplearon para ello la técnica dirigida SRM y cuantificaron 63 péptidos y proteínas antimicrobianas, mostrándose las de fold-change más destacable en la Tabla 7. Así, el estudio muestra un cambio en el perfil de algunos péptidos antimicrobianos en los pacientes con periodontitis fumadores y no fumadores frente a los sujetos periodontalmente sanos. Sin embargo, no se comparó la expresión de estas proteínas entre los sujetos con periodontitis fumadores y no fumadores.

Conviene mencionar que, en los dos estudios expuestos, el número de sujetos no fumadores y fumadores fue menor que en el presente estudio (Stein et al.: 8 no fumadores y 8 fumadores; Grant et al.: 11 sanos no fumadores y 11 fumadores, 10 periodontales no fumadores y 9 fumadores; nuestro estudio: 13 no fumadores y 17 fumadores). Además, el análisis de las muestras de FCG mediante una técnica proteómica sin etiquetado y no dirigida como la SWATH-MS nos permitió la identificación y cuantificación de un mayor número de proteínas.

Con anterioridad, empleando un ensayo de inmunofluorescencia con resolución temporal (time-resolved immunofluorescence assay), Liede et al. demostraron que la actividad proteolítica de las enzimas salivales y los niveles de la metaloproteinasa de matriz (MMP) 8 se mostraban menores en los fumadores actuales en comparación con los exfumadores (63). Realmente, aunque se ha demostrado que dejar de fumar disminuye el riesgo de periodontitis a niveles comparables con los individuos que nunca han fumado (16), nuestro estudio es el primero donde se ha evaluado su impacto en el proteoma periodontal.

4.3 Análisis de la estructura del proteoma periodontal en FCG

En primer lugar, evaluamos la estructura del proteoma periodontal de las muestras de FCG mediante un ACP. Este análisis permitió visualizar un alto grado de solapamiento entre las tres condiciones clínicas, siendo ligeramente más divergente en no fumadores con respecto a los fumadores y exfumadores. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los grupos.

Investigaciones previas han demostrado que la estructura del proteoma periodontal en FCG y saliva es diferente entre sujetos con periodontitis y periodontalmente sanos (29, 64). Sin embargo, hasta el momento no se había analizado esta estructura teniendo en cuenta el hábito tabáquico. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que lógicamente la condición de periodontitis es más relevante a la hora de alterar la estructura del proteoma periodontal, siendo el hábito tabáquico una variable no significativamente influyente en la estructura global.

4.4 Expresión diferencial de las proteínas cuantificadas

4.4.1 Grupo de no fumadores comparado con grupo de fumadores

Si comparamos la expresión de proteínas entre no fumadores y fumadores, 23 de las 250 proteínas cuantificadas (9.2%) demostraron estar diferencialmente expresadas. De ellas, 16 (69,6%) estuvieron subexpresadas en los no fumadores y sólo siete (30,4%) sobreexpresadas; de hecho, las proteínas más diferencialmente expresadas (mayor tamaño del efecto) fueron halladas en menor expresión en los no fumadores. Estos hallazgos revelan que en los pacientes periodontales fumadores se aprecia un predominio de ciertas proteínas sobreexpresadas.

Así, las cinco proteínas subexpresadas con tamaño del efecto grande (-1,24 – -0,83) en no fumadores en comparación con los fumadores (por tanto, sobreexpresadas en fumadores) fueron: proteína 5 de unión a ácidos grasos, cornulina, proteína-glutamina gamma-glutamyltransferasa E, factor de elongación 1-gamma y chaperona del retículo endoplásmico BiP. La proteína 5 de unión a ácidos grasos es un transportador intracelular de ácidos grasos, que modula la inflamación regulando la inducción de la prostaglandina E2 (65). Las proteínas de unión a ácidos grasos de adipocitos han demostrado ser biomarcadores de la inflamación en enfermedades sistémicas crónicas. Así, podría servir como un nuevo biomarcador inflamatorio de periodontitis y como un enfoque de tratamiento mediante su inhibición (66). Por su parte, la expresión de la cornulina, una proteína implicada en la diferenciación epitelial y la respuesta inmunitaria (67), está inducida por

citoquinas proinflamatorias (68) y en la literatura se muestra sobreexpresada en periodontitis frente a salud (50). La proteína-glutamina gamma-glutamyltransferasa E tiene una actividad catalítica que interviene en la formación de la envoltura cornificada de los queratinocitos (69). En relación con la periodontitis, estas enzimas parecen tener un papel clave en los procesos de remodelación, curación y adaptación gingivales (70). El factor de elongación 1-gamma facilita los eventos de elongación y sugiere una mayor actividad metabólica en la bolsa periodontal estando sobreexpresado en pacientes periodontales con respecto a sujetos sanos (71). La chaperona del retículo endoplásmico BiP desempeña un papel auxiliar en el transporte postraduccional de pequeñas proteínas presecretoras a través del retículo endoplásmico (72) y su papel en la periodontitis parece estar todavía por determinar. Por último, conviene mencionar que tres queratinas se muestran subexpresadas con un tamaño del efecto pequeño-mediano en no fumadores con respecto a fumadores (sobreexpresadas, por tanto, en fumadores): queratina, tipo II citoesquelética 4 (-0,79), queratina, tipo I citoesquelética 13 (-0,73) y queratina, tipo I citoesquelética 19 (-0,47). Consecuentemente, según nuestros resultados, en la periodontitis asociada al consumo de tabaco hay una sobreactivación de proteínas potenciadoras implicadas en la patogenia de la enfermedad, así como de varias queratinas que forman parte de la inmunidad innata sobreactivada frente a una sustancia extraña dañina como supone el tabaco (73).

Por otra parte, también resulta relevante analizar las proteínas que se mostraron sobreexpresadas (por tanto, infraexpresadas en fumadores). Las dos con tamaño del efecto grande (0,85) fueron la elastasa neutrofílica y olfactomedina-4. La elastasa neutrofílica hidroliza proteínas, modifica las funciones de las natural killer, los monocitos y los granulocitos e inhibe la liberación de enzimas y la quimiotaxis de los neutrófilos dependientes de C5a (74). Baliban et al. y Huynh et al. señalaron su relación con presencia y/o actividad de la periodontitis (75, 76), indicando que su sobreexpresión en periodontitis guía la fagocitosis, la lisis celular durante la inflamación, presentando una actividad antimicrobiana (76). En cuanto a la olfactomedina-4 (OLFM4), su regulación parece estar estrechamente ligada con la *Porphyromonas gingivalis*. Así, la regulación positiva de OLFM4 por parte de esta bacteria podría prevenir una respuesta inmune antibacteriana efectiva y contribuir a las propiedades sigilosas de este microorganismo. Además, *Streptococcus gordonii* inhibe la expresión de esta proteína, lo que favorecería una respuesta destructiva que potenciaría el desarrollo de la enfermedad. Por lo que la menor expresión de esta proteína hallada en los sujetos fumadores podría favorecer la actividad destructiva de la periodontitis (77). Por último, es interesante mencionar que tres de las cinco proteínas

sobreexpresadas (infraexpresadas en los fumadores) con tamaño del efecto mediano fueron Igs. (kappa variable 2-24, gamma 2 constante pesada y alfa 1 constante pesada), que constituyen la principal línea de defensa frente a bacterias al actuar como receptores que, al unirse a un antígeno específico, desencadenan la expansión clonal y la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas secretoras de Igs., para la eliminación de los antígenos unidos (78, 79). Este hecho resulta coherente con lo expuesto por Huang et al. en relación al cierto estado de inmunosupresión vinculado al consumo de tabaco (80). Estos resultados nos indican que el tabaco puede reducir la expresión de proteínas que limitan la destrucción periodontal, como el caso de la olfactomedina-4; así como también, inducir una menor expresión de proteínas con actividades antimicrobianas (inmunoglobulinas).

Tabla 8. Funciones de las principales proteínas del FCG con expresión diferencial en pacientes fumadores en comparación con los no fumadores (según hábito tabáquico).

Nombre de la proteína	Función en periodontitis	Expresión en fumadores
Proteína 5 de unión a ácidos grasos	Regulación de la inducción de PGE2 (66)	↑
Cornulina	Diferenciación epitelial y respuesta inmunitaria (67)	↑
Proteína-glutamina gamma-glutamyltransferasa E	Remodelación y curación gingival (68)	↑
Factor de elongación 1-gamma	Facilita eventos de elongación, actividad metabólica (71)	↑
Chaperona del retículo endoplásmico BiP	Desconocida	↑
Queratina, tipo II citoesquelética 4	Inmunidad innata frente a sustancia extraña dañina (tabaco) (73)	↑
Queratina, tipo I citoesquelética 13		↑
Queratina, tipo I citoesquelética 19		↑
Elastasa neutrofílica	Actividad antimicrobiana (76)	↓
Olfactomedina-4	Limitar la respuesta inflamatoria destructiva (77)	↓
Ig kappa variable 2-24	Línea defensiva frente a bacterias (78-80)	↓
Ig gamma 2 constante pesada		↓
Ig alfa 1 constante pesada		↓

Abreviaturas: BiP: proteína de unión a inmunoglobulina (binding immunoglobulin protein); Ig: inmunoglobulina; PGE2: prostaglandina E2.

4.4.2 Grupo de no fumadores comparado con grupo de exfumadores

Contrariamente, si comparamos el grupo de no fumadores vs exfumadores, aunque el número de proteínas diferencialmente expresadas fue similar (17, el 7% de las 250), la gran mayoría de ellas estuvieron reguladas al alza en no fumadores (15, el 88%, es decir infraexpresadas en exfumadores) y sólo dos (12%) reguladas a la baja (es decir, sobreexpresadas en exfumadores). Además, en este caso, las proteínas más diferencialmente expresadas estuvieron reguladas al alza en los no fumadores (es decir, infraexpresadas en exfumadores).

De las ocho proteínas sobreexpresadas en no fumadores (infraexpresadas en exfumadores) con un tamaño del efecto grande (0,80-1,26), cinco fueron Igs (alfa 1 pesada constante (1,26), kappa variable 3-15 (0,89), lambda variable 3-19 (0,87), variable pesada 1-69 (0,83) y kappa variable 2-24 (0,80)), manifestando que la función defensiva en pacientes exfumadores está más disminuída que en no fumadores y apoyando una vez más el cierto estado de inmunosupresión persistente vinculado al consumo de tabaco (80). Las tres restantes proteínas reguladas al alza (infraexpresadas en exfumadores) fueron alfa-2-macroglobulina, alfa-1-glicoproteína ácida 1 y alfa-1-antiquimotripsina. La alfa-2-macroglobulina es una proteína de fase aguda e inhibidora de proteinasas, que protege contra los daños inflamatorios. La presencia de niveles altos en el FCG podría asociarse a una acción antiinflamatoria, contrarrestando los procesos de degradación tisular y resorción ósea propios de la periodontitis (28). Igualmente, la alfa-1-glicoproteína ácida 1 también es una proteína de fase aguda, que se incrementa en respuesta a la infección bacteriana (actividad antiinflamatoria) (53). Por último, la función fisiológica de la alfa-1-antiquimotripsina aún no está clara, aunque parece que su objetivo fisiológico es la catepsina G de los neutrófilos (destrucción de bacterias mediada por neutrófilos) y la quimasa de los mastocitos (28, 81). Por tanto, desde el punto de vista de la enfermedad periodontal, constituiría una defensa natural al proteger a los tejidos periodontales del daño causado por las enzimas proteolíticas (28).

Frente a lo expuesto, tan sólo dos proteínas se mostraron reguladas a la baja (sobreexpresadas en exfumadores), ambas con tamaño del efecto grande (-0,90 – -0,92): fosfoglicerato quinasa 1 y proteína 14-3-3 zeta/delta. La fosfoglicerato quinasa 1 es una enzima glucolítica que cataliza reacciones productoras de adenosín trifosfato (ATP) (82, 83); incluyendo la remodelación o reprogramación metabólica del tejido periodontal (84). La proteína 14-3-3 zeta/delta regula la apoptosis y remodelación del tejido conjuntivo. En cuanto a su relación con la periodontitis, es posible que, la pérdida de control del ciclo celular y apoptótico conduzca a un desequilibrio de la

respuesta inmunitaria, promoviendo la destrucción incontrolada e irreversible mediada por el huésped (76).

Con todo, de forma similar a lo observado en fumadores, en los exfumadores se apreció una infraexpresión de proteínas con actividades antimicrobianas (inmunoglobulinas) con respecto a los no fumadores, aunque también de determinadas proteínas con acción antiinflamatoria.

Tabla 9. Funciones de las principales proteínas del FCG con expresión diferencial en pacientes exfumadores en comparación con los no fumadores (según hábito tabáquico).

Nombre de la proteína	Función en periodontitis	Expresión en exfumadores
Ig alfa 1 constante pesada	Línea defensiva frente a bacterias (78-80)	↓
Ig kappa variable 3-15		↓
Ig lambda variable 3-19		↓
Ig pesada variable 1-69		↓
Ig kappa variable 2-24		↓
Alfa-2-macroglobulina	Acción antiinflamatoria: contrarresta degradación tisular y resorción ósea (28)	↓
Alfa-1-glicoproteína ácida 1	Acción antiinflamatoria: proteína de fase aguda (53)	↓
Alfa-1-antiquimotripsina	Defensa natural; protección de tejidos periodontales del daño causado por enzimas proteolíticas (28)	↓
Fosfoglicerato quinasa 1	Remodelación o reprogramación metabólica del tejido periodontal (84)	↑
Proteína 14-3-3 zeta/delta	Favorece desequilibrio de la respuesta inmunitaria: destrucción incontrolada mediada por el huésped (76)	↑

Abreviaturas: Ig: inmunoglobulina.

4.4.3 Grupo de exfumadores comparado con grupo de fumadores

Por último, si comparamos el grupo de los exfumadores con el de los fumadores actuales, el número de proteínas diferencialmente expresadas se reduce a ocho (3%), de las cuales siete estuvieron subexpresadas en exfumadores y tan sólo una sobreexpresada (es decir, sobreexpresadas e infraexpresadas en fumadores, respectivamente). Sin embargo, esta única proteína, la profilina-1, fue la que demostró estar más diferencialmente expresada, con un tamaño del efecto de 1,07. Es una proteína de unión a la actina que afecta a la estructura del citoesqueleto (85). En algún estudio se ha observado sobreexpresada en pacientes periodontales (86), y aunque aún no se ha aclarado su papel en los procesos inflamatorios, se ha asociado a la progresión de la periodontitis (87).

Otras dos proteínas demostraron estar diferencialmente expresadas con un tamaño del efecto grande, pero infraexpresadas (-0,87 – -0,95, es decir, sobreexpresadas en fumadores): chaperona del retículo endoplásmico BiP y alfa-1-glicoproteína ácida 1. Como mencionamos, de la primera aún no se ha aclarado el papel en la periodontitis y la segunda es una proteína de fase aguda con actividad antiinflamatoria (53).

Por tanto, comprobamos que en esta comparativa las diferencias fueron menos significativas y afectó a un menor número de proteínas. Se aprecia cierta persistencia del efecto del tabaco a largo plazo sobre la funcionalidad proteica asociada a la periodontitis. Se encontró sobreexpresión en exfumadores de alguna proteína asociada positivamente con la progresión de la periodontitis (profilina-1), como también infraexpresión de otras con acción antiinflamatoria (alfa-1-glicoproteína ácida).

Tabla 10. Funciones de las principales proteínas del FCG con expresión diferencial en pacientes fumadores en comparación con los exfumadores (según hábito tabáquico).

Nombre de la proteína	Función en periodontitis	Expresión en fumadores	Expresión en exfumadores
Profilina-1	Favorece progresión de periodontitis (inflamación) (87)	↓	↑
Chaperona del retículo endoplásmico BiP	Desconocida	↑	↓
Alfa-1-glicoproteína ácida 1	Acción antiinflamatoria: proteína de fase aguda (53)	↑	↓

Abreviaturas: BiP: proteína de unión a inmunoglobulina (binding immunoglobulin protein).

4.4.4 Comparación de los resultados obtenidos en los tres grupos clínicos

Si comparamos los resultados obtenidos en los tres grupos clínicos podemos observar que chaperona del retículo endoplásmico BiP y queratina, tipo II citoesquelética 4 se hallaron subexpresadas en no fumadores y exfumadores en comparación con el grupo de fumadores (es decir, sobreexpresadas en fumadores). Por lo tanto, fumar incrementa la expresión de estas dos proteínas. Como se ha mencionado anteriormente, la relación de la primera con la periodontitis todavía es incierta, pero la queratina, tipo II citoesquelética 4, como todas las queratinas, es esencial para el mantenimiento de la integridad epitelial, de modo que una vez que dicha integridad se ve alterada por el biofilm, las bacterias asociadas pueden invadir los tejidos periodontales más profundos, desencadenando una respuesta inflamatoria. Así, estas conexiones célula-célula son una parte crucial de la respuesta inmunitaria innata, con el fin de combatir el desafío tóxico y microbiano (73). Por lo que, como se mencionó previamente, la sobreexpresión de queratinas en

pacientes fumadores responde a una potenciación de la inmunidad innata. Así, en base a nuestros resultados, su sobreexpresión persiste mientras se fuma, pero retorna a niveles no significativamente diferentes tras dejar fumar (Tabla 11).

En contraposición, las Ig alfa 1 constante pesada y kappa variable 2-24 se hallaron sobreexpresadas en no fumadores con respecto a los fumadores y a los exfumadores (es decir, infraexpresadas en la condición tabáquica). Por lo que el consumo actual o previo de tabaco reduce su expresión (88). Dado que dichas proteínas de la inmunidad humoral constituyen una línea defensiva frente a bacterias, de estos datos se interpreta que la función antimicrobiana puede verse comprometida por el tabaco incluso años después de haberlo dejado (Tabla 11).

Tabla 11. Posible relación con la periodontitis e interpretación de las proteínas con expresión diferencial en no fumadores vs fumadores, no fumadores vs exfumadores y exfumadores vs fumadores.

Condición			Nombre de la proteína	Posible relación con la periodontitis o el tabaco	Interpretación
NF vs F	NF vs EX	EX vs F			
SUB	NS	SUB	Chaperona del RE BiP	Desconocida	Fumar incrementa la expresión respecto a NF y EX
			Queratina, tipo II citoesquelética 4	Mantenimiento de la integridad epitelial (73)	
SOBRE	SOBRE	NS	Ig alfa 1 constante pesada	Línea defensiva frente a bacterias (88)	Fumar o haberlo dejado reduce la expresión respecto a NF
			Ig kappa variable 2-24	Línea defensiva frente a bacterias (88)	
NS	SOBRE	SUB	Alfa-1-antiquimotripsina	Defensa natural; protección de tejidos periodontales del daño causado por enzimas proteolíticas (28)	Fumar incrementa la expresión respecto a EX Haber sido fumador reduce la expresión respecto a NF
			Alfa-1-glicoproteína ácida 1	Proteína de fase aguda, actividad antiinflamatoria (53)	
			Subunidad gamma-2 de la Hb	Sangrado debido a la inflamación (89)	

Abreviaturas: BiP: proteína de unión a inmunoglobulina (binding immunoglobulin protein); EX: exfumadores; F: fumadores; Hb: hemoglobina; Ig: inmunoglobulina; NF: no fumadores; NS: no significativo; RE: retículo endoplasmático; SOBRE: sobreexpresadas; SUB: subexpresadas; vs: versus.

Se consideraron proteínas diferencialmente expresadas para un valor $p < 0,05$ y tamaño del efecto $> 0,2$ (sobreexpresada) o $< -0,2$ (subexpresada).

Por otra parte, alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-glicoproteína ácida 1 y la subunidad gamma-2 de la Hb se hallaron reguladas al alza en no fumadores en comparación con los exfumadores (es decir, infraexpresadas en exfumadores), mientras que la comparativa de exfumadores con respecto a fumadores se mostraron subexpresadas (es decir, sobreexpresadas en fumadores). La alfa-1-antiquimotripsina constituye una defensa natural al regular la destrucción de bacterias mediada por neutrófilos a través de la cathepsina G y proteger los tejidos periodontales del daño causado por

enzimas proteolíticas (28). Por su parte, la alfa-1-glicoproteína ácida 1 presenta actividad antiinflamatoria (53) y la subunidad gamma-2 de la Hb está implicada en el sangrado vinculado al proceso inflamatorio de la periodontitis (89). De estos resultados se interpreta que inicialmente la acción del tabaco no condiciona la actividad de estas proteínas vinculadas a un papel antiinflamatorio y de tendencia al sangrado, pero el haberlo dejado implica una reducción de su expresión (Tabla 11).

5. Conclusiones

En conclusión, la condición tabáquica no modifica significativamente la estructura del proteoma periodontal del FCG en sujetos con periodontitis en estadios III y IV.

Sin embargo, en pacientes periodontales fumadores hay diversas proteínas diferencialmente expresadas con respecto a los sujetos que nunca han fumado, potenciándose varias queratinas vinculadas a la inmunidad innata y proteínas asociadas a la progresión de la periodontitis.

El tabaco también induce una menor expresión de inmunoglobulinas con actividad antimicrobiana, persistiendo este efecto sobre la inmunidad humoral incluso años después de haber dejado de fumar.

Referencias bibliográficas

- (1) Chapple ILC, Mealey BL, Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. 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. *J Clin Periodontol* 2018 Jun;89:S74-S84.
- (2) Bernabe E, Marcenes W, Hernandez CR, Bailey J, Abreu LG, Alipour V, et al. Global, regional, and national levels and trends in burden of oral conditions from 1990 to 2017: a systematic analysis for the global burden of disease 2017 study. *JDR* 2020 Apr;99(4):362-373.
- (3) Chen MX, Zhong YJ, Dong QQ, Wong HM, Wen YF. Global, regional, and national burden of severe periodontitis, 1990-2019: An analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *J Clin Periodontol*. 2021 Sep;48(9):1165-1188.
- (4) Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3(1):17039-17038.
- (5) Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci* 2019 Nov 5;11(3):30.
- (6) Hajishengallis G, Chavakis T, Lambris JD. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontol 2000* 2020 Oct;84(1):14-34.
- (7) Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S162-S170.
- (8) Graziani F, Tsakos G. Patient-based outcomes and quality of life. *Periodontol 2000*. 2020 Jun;83(1):277-294.
- (9) Monsarrat P, Blaizot A, Kémoun P, Ravaud P, Nabet C, Sixou M, et al. Clinical research activity in periodontal medicine: a systematic mapping of trial registers. *J Clin Periodontol*. 2016 May;43(5):390-400.
- (10) Larvin H, Kang J, Aggarwal VR, Pavitt S, Wu J. Risk of incident cardiovascular disease in people with periodontal disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Dent Res*. 2021 Feb;7(1):109-122.
- (11) Stöhr J, Barbaresko J, Neuenschwander M, Schlesinger S. Bidirectional association between periodontal disease and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Sci Rep*. 2021 Jul 1;11(1):13686.
- (12) Asher S, Stephen R, Mäntylä P, Suominen AL, Solomon A. Periodontal health, cognitive decline, and dementia: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Geriatr Soc* 2022 Sep;70(9):2695-2709.
- (13) Zhang Y, Feng W, Li J, Cui L, Chen Z. Periodontal disease and adverse neonatal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Front pediatr* 2022;10:799740.

- (14) Bouchard P, Carra MC, Boillot A, Mora F, Rangé H. Risk factors in periodontology: a conceptual framework. *J Clin Periodontol* 2017 Feb;44(2):125-131.
- (15) Leite FRM, Nascimento GG, Scheutz F, López R. Effect of smoking on periodontitis: a systematic review and meta-regression. *Am J Prev Med*. 2018 Jun;54(6):831-841.
- (16) Leite FRM, Nascimento GG, Baake S, Pedersen LD, Scheutz F, López R. Impact of smoking cessation on periodontitis: a systematic review and meta-analysis of prospective longitudinal observational and interventional studies. *Nicotine Tob Res*. 2019 Nov 19;21(12):1600-1608.
- (17) Bostanci N, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid and its immune mediators in the proteomic era. *Periodontol 2000*. 2018 Feb;76(1):68-84.
- (18) Toker H, Akpınar A, Aydın H, Poyraz O. Influence of smoking on interleukin-1beta level, oxidant status and antioxidant status in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients before and after periodontal treatment. *J Periodontal Res*. 2012 Oct;47(5):572-577.
- (19) Lütfoğlu M, Aydoğdu A, Sakallıoğlu EE, Alaçam H, Pamuk F. Gingival crevicular fluid interleukin-8 and lipoxin A4 levels of smokers and nonsmokers with different periodontal status: a cross-sectional study. *J Periodontal Res*. 2016 Aug 1;51(4):471-480.
- (20) Dutra TP, Sacramento CM, Nagay BE, Magno MB, Marañón-Vásquez GA, Maia LC, et al. Do smokers have a different gingival crevicular fluid cytokine/chemokine profile than nonsmokers in clinically healthy periodontal sites? A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Invest*. 2022 Feb 1;26(2):1183-1197.
- (21) Apatzidou DA. The role of cigarette smoking in periodontal disease and treatment outcomes of dental implant therapy. *Periodontol 2000*. 2022 Oct;90(1):45-61.
- (22) Bostanci N, Bao K. Contribution of proteomics to our understanding of periodontal inflammation. *Proteomics*. 2017 Feb;17(3-4).
- (23) Anjo SI, Santa C, Manadas B. SWATH-MS as a tool for biomarker discovery: From basic research to clinical applications. *Proteomics*. 2017 Feb;17(3-4).
- (24) Meyer JG, Schilling B. Clinical applications of quantitative proteomics using targeted and untargeted data-independent acquisition techniques. *Expert Rev Proteomics*. 2017 May 4;14(5):419-429.
- (25) Ludwig C, Gillet L, Rosenberger G, Amon S, Collins BC, Aebersold R. Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol*. 2018 Aug 13;14(8):e8126.
- (26) Fontana S, Mauceri R, Novara ME, Alessandro R, Campisi G. Protein cargo of salivary small extracellular vesicles as potential functional signature of oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 16;22(20):11160.
- (27) Lorenzo-Pouso AI, Bravo SB, Carballo J, Chantada-Vázquez MDP, Bagán J, Bagán L et al. Quantitative proteomics in medication-related osteonecrosis of the jaw: A proof-of-concept study. *Oral Dis*. 2023 Jul;29(5):2117-2129.

- (28) Bellei E, Bertoldi C, Monari E, Bergamini S. Proteomics disclose the potential of gingival crevicular fluid (gcf) as a source of biomarkers for severe periodontitis. *Materials (Basel)*. 2022 Mar 15;15(6):2161.
- (29) Yi J, Shen Y, Yang Y, Shen C, Liu B, Qiao L, et al. Direct MALDI-TOF profiling of gingival crevicular fluid sediments for periodontitis diagnosis. *Talanta* 2021 Apr 1;225:121956.
- (30) Kim JS, Cho I, Kim K, Hwang YS. Identification of galectin-10 as a biomarker for periodontitis based on proteomic analysis of gingival crevicular fluid. *Mol Med Rep*. 2021 Feb;23(2):123.
- (31) Stein SH, Wendell KJ, Pabst M, Scarbecz M. Profiling gingival crevicular fluid from smoking and non-smoking chronic periodontitis patients. *J Tenn Dent Assoc*. 2006;86(2):20-24.
- (32) Grant M, Kilsgård O, Åkerman S, Klinge B, Demmer RT, Malmström J, Jönsson D. The human salivary antimicrobial peptide profile according to the oral microbiota in health, periodontitis and smoking. *J Innate Immun*. 2019;11(5):432-444.
- (33) Binti Badlishah Sham NI, Lewin SD, Grant MM. Proteomic investigations of in vitro and in vivo models of periodontal disease. *Proteomics Clin Appl*. 2020 May;14(3):e1900043.
- (34) Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45(S20):S149-S161.
- (35) Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45(S20):S1-S8.
- (36) World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013 Nov 27;310(20):2191-4.
- (37) Bonzon-Kulichenko E, Pérez-Hernández D, Núñez E, Martínez-Acedo P, Navarro P, Trevisan-Herraz M, et al. A robust method for quantitative high-throughput analysis of proteomes by 18O labeling. *Mol Cell Proteomics*. 2011 Jan;10(1):M110.003335.
- (38) Perez-Hernandez D, Gutiérrez-Vázquez C, Jorge I, López-Martín S, Ursa A, Sánchez-Madrid F, Vázquez J, Yáñez-Mó M. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem*. 2013 Apr 26;288(17):11649-61.
- (39) UniProt Consortium. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(Database issue):D191-8.
- (40) Aggarwal S, Yadav AK. False Discovery Rate Estimation in Proteomics. *Methods Mol Biol*. 2016;1362:119-28.
- (41) Colangelo CM, Ivosev G, Chung L, Abbott T, Shifman M, Sakaue F, et al. Development of a highly automated and multiplexed targeted proteome pipeline and assay for 112 rat brain synaptic proteins. *Proteomics*. 2015 Apr;15(7):1202-1214.

- (42) R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2022. Available from: <https://www.R-project.org/>.
- (43) Lê S, Josse J, Husson F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J Stat Softw* 2008;25(1):1-18.
- (44) Kassambara A, Mundt F. *_factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses_*. R package version 1.0.7. 2020. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>.
- (45) Oksanen J, Simpson G, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin P, et al. *_vegan: Community Ecology Package_*. R package version 2.6-4. 2022. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- (46) Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* 2001 Feb;26(1):32-46.
- (47) Torchiano M. *_effsize: Efficient Effect Size Computation_*. R package version 0.8.1. 2020.
- (48) Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2.ed. New York: Erlbaum; 1988.
- (49) Li X, Wang W, Chen J. Recent progress in mass spectrometry proteomics for biomedical research. *Sci China Life Sci*. 2017;60(10):1093-1113.
- (50) Carneiro LG, Nouh H, Salih E. Quantitative gingival crevicular fluid proteome in health and periodontal disease using stable isotope chemistries and mass spectrometry. *J Clin Periodontol*. 2014 Aug;41(8):733-747.
- (51) Grant MM, Taylor JJ, Jaedicke K, Creese A, Gowland C, Burke B, et al. Discovery, validation, and diagnostic ability of multiple protein-based biomarkers in saliva and gingival crevicular fluid to distinguish between health and periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2022 Jul;49(7):622-632.
- (52) Tsuchida S, Satoh M, Kawashima Y, Sogawa K, Kado S, Sawai S, et al. Application of quantitative proteomic analysis using tandem mass tags for discovery and identification of novel biomarkers in periodontal disease. *Proteomics*. 2013 Aug;13(15):2339-2350.
- (53) Bostanci N, Heywood W, Mills K, Parkar M, Nibali L, Donos N. Application of label-free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MS E (gingival exudatome). *J Proteome Res*. 2010 May 7;9(5):2191-9.
- (54) Silva-Boghossian CM, Colombo AP, Tanaka M, Rayo C, Xiao Y, Siqueira WL. Quantitative proteomic analysis of gingival crevicular fluid in different periodontal conditions. *PLoS One*. 2013 Oct 1;8(10):e75898.
- (55) Anand S, Samuel M, Ang CS, Keerthikumar S, Mathivanan S. Label-Based and Label-Free Strategies for Protein Quantitation. *Methods Mol Biol*. 2017;1549:31-43
- (56) Mertens B, Orti V, Vialaret J, Gibert P, Relaño-Ginés A, Lehmann S, et al. Assessing a multiplex-targeted proteomics approach for the clinical diagnosis of periodontitis using saliva samples. *Bioanalysis* 2018;10(1):35-45.

- (57) Bostanci N, Selevsek N, Wolski W, Grossmann J, Bao K, Wahlander A, et al. Targeted proteomics guided by label-free quantitative proteome analysis in saliva reveal transition signatures from health to periodontal disease. *Mol Cell Proteomics*. 2018 Jul;17(7):1392-1409.
- (58) Chantada-Vázquez MDP, García Vence M, Serna A, Núñez C, Bravo SB. SWATH-MS protocols in human diseases. *Methods Mol Biol*. 2021;2259:105-141.
- (59) Noh JW, Jang JH, Yoon HS, Kim KB, Heo MH, Jang HE, Kim YJ, Lee Y. Evaluation of salivary biomarkers of periodontal disease based on smoking status: a systematic review. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Nov 7;19(21):14619.
- (60) Arias-Bujanda N, Regueira-Iglesias A, Alonso-Sampedro M, González-Peteiro MM, Mira A, Balsa-Castro C, et al. Cytokine thresholds in gingival crevicular fluid with potential diagnosis of chronic periodontitis differentiating by smoking status. *Sci Rep*. 2018;8(1):18003-12.
- (61) Arias-Bujanda N, Regueira-Iglesias A, Blanco-Pintos T, Alonso-Sampedro M, Relvas M, González-Peteiro MM, et al. Diagnostic accuracy of IL1 β in saliva: The development of predictive models for estimating the probability of the occurrence of periodontitis in non-smokers and smokers. *J Clin Periodontol*. 2020 Jun;47(6):702-714.
- (62) Blanco-Pintos T, Regueira-Iglesias A, Balsa-Castro C, Tomás I. Update on the role of cytokines as oral biomarkers in the diagnosis of periodontitis. *Adv Exp Med Biol*. 2022 May 26;1373:283-302.
- (63) Liede KE, Haukka JK, Hietanen J, Mattilla M, Rönkö H, Sorsa T. The association between smoking cessation and periodontal status and salivary proteinase levels. *J Periodontol*. 1999;70:1361-1368.
- (64) Shin M, Kim Y, Shin YJ, Ko BJ, Kim S, Kim H. Deep sequencing salivary proteins for periodontitis using proteomics. *Clin Oral Investig*. 2019 Sep;23(9):3571-3580.
- (65) Kaczocha M, Vivieca S, Sun J, Glaser ST, Deutsch DG. Fatty acid-binding proteins transport N-acylethanolamines to nuclear receptors and are targets of endocannabinoid transport inhibitors. *J Biol Chem*. 2012 Jan 27;287(5):3415-24.
- (66) Soubiya, Madaiah H, Tarannum F, Faizuddin M. Association of adipocyte fatty acid-binding protein and tumor necrosis factor alpha with periodontal health and disease: A cross-sectional investigation. *Dent Res J (Isfahan)*. 2021 Sep 25;18:79.
- (67) Pawar H, Maharudraiah J, Kashyap MK, Sharma J, Srikanth SM, Choudhary R et al. Downregulation of cornulin in esophageal squamous cell carcinoma. *Acta Histochem*. 2013 Mar;115(2):89-99.
- (68) Li C, Xiao L, Jia J, Li F, Wang X, Duan Q, Jing H et al. Cornulin is induced in psoriasis lesions and promotes keratinocyte proliferation via phosphoinositide 3-kinase/akt pathways. *JID*. 2019;139:71-80.
- (69) Jeong EM, Lee KB, Kim GE, Kim CM, Lee JH, Kim HJ et al. Competitive binding of magnesium to calcium binding sites reciprocally regulates transamidase and gtp hydrolysis activity of transglutaminase 2. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan 25;21(3):791.

- (70) Currò M, Matarese G, Isola G, Caccamo D, Ventura VP, Cornelius C et al. Differential expression of transglutaminase genes in patients with chronic periodontitis. *Oral Diseases*. 2014 Sep;20(6):616-23.
- (71) Baliban RC, Sakellari D, Li Z, DiMaggio PA, Garcia BA, Floudas CA. Novel protein identification methods for biomarker discovery via a proteomic analysis of periodontally healthy and diseased gingival crevicular fluid samples. *J Clin Periodontol*. 2012 Mar;39(3):203-12.
- (72) Kang JM, Park S, Kim SJ, Kim H, Lee B, Kim J et al. KIAA1324 Suppresses gastric cancer progression by inhibiting the oncoprotein GRP78. *Cancer Res*. 2015 Aug 1;75(15):3087-97.
- (73) Groeger S, Meyle J. Oral Mucosal Epithelial Cells. *Front Immunol*. 2019 Feb 14;10:208.
- (74) Tralau T, Meyer-Hoffert U, Schröder JM, Wiedow O. Human leukocyte elastase and cathepsin G are specific inhibitors of C5a-dependent neutrophil enzyme release and chemotaxis. *Exp Dermatol*. 2004 May;13(5):316-25.
- (75) Baliban RC, Sakellari D, Li Z, Guzman YA, Garcia BA, Floudas CA. Discovery of biomarker combinations that predict periodontal health or disease with high accuracy from GCF samples based on high-throughput proteomic analysis and mixed-integer linear optimization. *J Clin Periodontol*. 2013 Feb;40(2):131-9.
- (76) Huynh AH, Veith PD, McGregor NR, Adams GG, Chen D, Reynolds EC et al. Gingival crevicular fluid proteomes in health, gingivitis and chronic periodontitis. *J Periodontal Research*. 2014;50(5):637-649.
- (77) Fitzsimonds Z, Liu C, Strocke K, Yakoumatos L, Shumway B, Miller D et al. Regulation of olfactomedin 4 by *Porphyromonas gingivalis* in a community context. *ISME J*. 2021;15:2627–2642.
- (78) Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S41-52.
- (79) McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol*. 2011 Dec 9;12(1):24-34.
- (80) Huang C, Shi G. Smoking and microbiome in oral, airway, gut and some systemic diseases. *J Transl Med*. 2019 Jul 15;17(1):225
- (81) Fitos I, Visy J, Zsila F, Mády G, Simonyi M. Selective binding of imatinib to the genetic variants of human alpha1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Nov;1760(11):1704-12.
- (82) Bollong MJ, Lee G, Coukos JS, Yun H, Zambaldo C, Chang JW et al. A metabolite-derived protein modification integrates glycolysis with KEAP1-NRF2 signalling. *Nature*. 2018 Oct;562(7728):600-604.
- (83) Fujii H, Krietsch WK, Yoshida A. A single amino acid substitution (Asp leads to Asn) in a phosphoglycerate kinase variant (PGK München) associated with enzyme deficiency. *J Biol Chem*. 1980 Jul 10;255(13):6421-3.

- (84) Zebrowitz E, Aslanukov A, Kajikawa T, Bedelbaeva K, Bollinger S, Zhang1 Y et al. Prolyl-hydroxylase inhibitor-induced regeneration of alveolar bone and soft tissue in a mouse model of periodontitis through metabolic reprogramming. *Front. Dent. Med.* 2022 Nov 25;3.
- (85) Shao J, Welch WJ, Diprospero NA, Diamond MI. Phosphorylation of profilin by ROCK1 regulates polyglutamine aggregation. *Mol Cell Biol.* 2008 Sep;28(17):5196-208.
- (86) Gesell M, Jehmlich N, Murr A, Dhople VM, Holtfreter B, Hammer E et al. Identification of periodontitis associated changes in the proteome of whole human saliva by mass spectrometric analysis. *J Clin Periodontol.* 2013;40(9):825-832.
- (87) Choi, YJ., Heo, SH., Lee, JM. et al. Identification of azurocidin as a potential periodontitis biomarker by a proteomic analysis of gingival crevicular fluid. *Proteome Sci.* 2011;42(9).
- (88) Albandar JM, DeNardin AM, Adesanya MR, Diehl SR, Winn DM. Associations between serum antibody levels to periodontal pathogens and early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 2001 Nov;72(11):1463-9.
- (89) Guzman YA, Sakellari D, Arsenakis M, Floudas CA. Proteomics for the discovery of biomarkers and diagnosis of periodontitis: a critical review. *Expert Rev Proteomics.* 2014 Feb;11(1):31-41.

Apéndice S1: Comité ético



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Ana Estany Gestal, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 23 de noviembre de 2021 el estudio:

Título: Identificación de nuevos biomarcadores moleculares con elevada precisión diagnóstica para detectar la periodontitis no tratada y su respuesta al tratamiento

Versión: 2.0

Promotor/a: Inmaculada Tomás Carmona

Investigador/a: Inmaculada Tomás Carmona

Código de Registro: 2021/417

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos legales aplicables y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del citado estudio.

Documento asinado dixitalmente por:
Ana Estany Gestal (30/11/2021 13:36)
<https://sede.xunta.gal/cve?dcve=SAOC-F4G4-BOAH-OF40-TWFB-N4DG-1GTH-R163-8275-7817-52>



NOTA: Se le recuerda que en el caso de que en este estudio se recluten pacientes, el equipo investigador debe tener disponible el Documento de Consentimiento Informado (Hojas de Información y Hojas de Firma) tanto en *galego* como en castellano en el momento de comenzar el reclutamiento.



Y HACE CONSTAR QUE:

1.- El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo cumple tanto en su composición como en sus PNTs los requisitos legales vigentes.

2.- La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo es:

Presidenta

Pilar Rodríguez Ledo. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Vicepresidenta

María Mercedes Rodicio García. Médico especialista en Pediatría.

Secretaria

Ana Estany Gestal. Licenciada en Farmacia.

Vicesecretaria

Catalina Caamaño Isorna. Farmacéutica de Atención Primaria.

Vocales

Lorenzo Armenteros del Olmo. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Beatriz Bernardez Ferrán. Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria

Cristina Blanco Freire. Enfermera.

Francisco Campos Pérez. Licenciado en Biología.

Jesús Fernández Álvarez. Miembro lego.

Ricardo García Martínez. Licenciado en Derecho.

Eva Marcos Doldán. Analista-programadora.

Jesús Prego Domínguez. Enfermero.

Carlos Rodríguez Moreno. Médico especialista en Farmacología Clínica.

Juan Manuel Vázquez Lago. Médico especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.

Para que conste donde proceda, y a petición de quien proceda, en Santiago de Compostela,

La Secretaria del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,

