



FACULTADE DE MEDICINA
E ODONTOLOXÍA

Traballo de
fin de grao

Impacto do hábito tabáquico e idade na predición diagnóstica de biomarcadores moleculares subxinxivais de periodontite

Impacto del hábito tabáquico y la edad en la predicción diagnóstica de biomarcadores moleculares subgingivales de periodontitis

Impact of smoking habit and age on the diagnostic prediction of subgingival molecular biomarkers of periodontitis

Autora: María Insua López

Titora: Inmaculada Tomás Carmona

Cotitora: Triana Blanco Pintos

Departamento: Cirurxía e Especialidades Médico-Cirúrxicas

Xullo 2025

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

Al grupo Oral Sciences Research Group y a la Dra. Inmaculada Tomás, por ser mi tutora, y por todo lo aprendido este último curso al darme la oportunidad de formar parte de su Unidad de Pacientes con Necesidades Especiales (USC).

A todas mis compañeras allí, y en especial a Triana, por su compromiso y trato cercano, y por haberme ayudado a seguir sus pasos en la creación de este trabajo.

Por último, muchas gracias a mi familia por su apoyo incondicional estos años y tener confianza plena en mí, por acompañarme en este camino hasta el final.

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 gingival crevicular y 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..... | 11 |
| 2.4. Análisis estadístico | 11 |
| 2.4.1. Comparación de las características clínicas entre los sujetos de control y los pacientes con periodontitis | 12 |
| 2.4.2. Análisis de modelos predictivos de diagnóstico..... | 12 |
| 3. Resultados | 14 |
| 3.1. Características clínicas | 14 |
| 3.2. Proteínas cuantificadas por SWATH-MS | 14 |
| 3.3. Modelización predictiva de las proteínas del FGC..... | 16 |
| 3.3.1. Precisión diagnóstica de las proteínas del FGC sin ajustar | 16 |
| 3.3.2. Precisión diagnóstica de las proteínas del FGC ajustadas por edad | 17 |
| 3.3.3. Precisión diagnóstica de las proteínas del FGC ajustadas por hábito tabáquico | 18 |
| 4. Discusión | 22 |
| 4.1. Precisión diagnóstica de los biomarcadores subgingivales sin ajustar y relación con la periodontitis | 22 |
| 4.2. Influencia de las variables clínicas de edad y hábito tabáquico en la capacidad predictiva de los biomarcadores subgingivales | 24 |
| 4.3. Relevancia clínica y perspectivas futuras | 26 |
| 5. Conclusión | 28 |
| Referencias bibliográficas | 29 |
| Apéndice S1: Comité ético | 38 |

Resumo

Obxectivo: Avaliar o impacto das variables clínicas de idade e hábito de fumar na capacidade diagnóstica das proteínas subxinxivais para detectar a periodontite.

Material e métodos: Recolléronse mostras de fluído xinxival crevicular (FXC) de 44 suxeitos periodontalmente sans e 40 con periodontite en estadios III-IV. As mostras foron analizadas coa técnica proteómica “sequential window acquisition of all theoretical mass spectra” (SWATH-MS). As proteínas identificáronse utilizando a base de datos UniProt e avalioue a súa capacidade diagnóstica mediante o paquete “generalised additive models” (GAM). Os modelos proteicos individuais obtidos foron calculados sen axustar e axustándose por idade e tabaco (anos fumando e índice paquete-ano). Aplicouse validación cruzada con tres particións para controlar o sobreaxuste dos modelos predictivos, e calculáronse os parámetros de clasificación.

Resultados: As oito proteínas avaliadas (gliceraldehído-3-fosfato deshidroxenase [GAPDH], queratina, tipo II citoesquelética 6A, proteína do gránulo de zimóxico 16 homóloga B [ZG16B], inhibidor da protease plasmática C1, anhidrase carbónica 1 e as subunidades da hemoglobina [Hbs] alfa, beta e delta) mostraron unha precisión (PRE) de 64,3-91,7% (sensibilidade/especificidade de 42,5-95,0%/68,2-88,6%) sen axustar. Axustándose por idade, a capacidade predictiva aumentou para os oito biomarcadores (PRE: 88,1-96,4%; sensibilidade/especificidade: 87,5-97,5%/81,8-97,7%). Segundo o hábito de fumar, o rendemento mellorou para seis proteínas (PRE: 81,0-92,9%; sensibilidade/especificidade: 67,5-95,0%/72,7-93,2%), pero reduciuse para a GAPDH considerando os anos fumando e índice paquete-ano (PRE: 71,4% e 85,7%; sensibilidade/especificidade: 72,5% e 87,5%/70,5% e 84,1%) e para a Hb beta considerando os anos fumando (PRE: 72,6%; sensibilidade/especificidade: 57,5%/86,4%).

Conclusións: A idade e hábito de fumar inflúen na precisión diagnóstica das proteínas subxinxivais para detectar a periodontite. O impacto da idade resulta máis consistente e sistemático permitindo alcanzar valores predictivos excepcionais. O efecto do tabaco é máis variable e dependente do biomarcador. Con todo, estes resultados deben ser validados en futuras investigacións.

Palabras chave: periodontite, biomarcadores, fluído xinxival crevicular, proteómica, SWATH-MS, idade, tabaquismo.

Resumen

Objetivo: Evaluar el impacto de las variables clínicas de edad y hábito tabáquico en la capacidad diagnóstica de las proteínas subgingivales para detectar la periodontitis.

Material y métodos: Se recogieron muestras de fluido gingival crevicular (FGC) de 44 sujetos periodontalmente sanos y 40 con periodontitis en estadios III-IV. Las muestras fueron analizadas con la técnica proteómica “sequential window acquisition of all theoretical mass spectra” (SWATH-MS). Las proteínas se identificaron utilizando la base de datos UniProt evaluándose su capacidad diagnóstica mediante el paquete “generalised additive models” (GAM). Los modelos proteicos individuales fueron calculados sin ajustar y ajustándose por edad y hábito tabáquico (años fumando e índice paquete-año). Se aplicó validación cruzada con tres particiones para controlar el sobreajuste de los modelos predictivos calculándose los parámetros de clasificación.

Resultados: Las ocho proteínas evaluadas (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa [GAPDH], queratina, tipo II citoesquelética 6A, proteína del gránulo de zimógeno 16 homóloga B [ZG16B], inhibidor de la proteasa plasmática C1, anhidrasa carbónica 1 y las subunidades de la hemoglobina [Hbs] alfa, beta y delta) mostraron una precisión (PRE) de 64,3-91,7% (sensibilidad/especificidad de 42,5-95,0%/68,2-88,6%) sin ajustar. Ajustándose por edad, la capacidad predictiva aumentó para los ocho biomarcadores (PRE: 88,1-96,4%; sensibilidad/especificidad: 87,5-97,5%/81,8-97,7%). De acuerdo con el hábito tabáquico, el rendimiento mejoró para seis proteínas (PRE: 81,0-92,9%; sensibilidad/especificidad: 67,5-95,0%/72,7-93,2%), pero se redujo para la GAPDH considerando años fumando e índice paquete-año (PRE: 71,4% y 85,7%; sensibilidad/especificidad: 72,5% y 87,5%/70,5% y 84,1%) y para la Hb beta considerando los años fumando (PRE: 72,6%; sensibilidad/especificidad: 57,5%/86,4%).

Conclusiones: La edad y hábito tabáquico influyen en la precisión diagnóstica de las proteínas subgingivales para detectar la periodontitis. El impacto de la edad resulta más consistente y sistemático permitiendo alcanzar valores predictivos excepcionales. El efecto del tabaco es más variable y dependiente del biomarcador. No obstante, estos resultados deben ser validados en futuras investigaciones.

Palabras clave: periodontitis, biomarcadores, fluido gingival crevicular, proteómica, SWATH-MS, edad, tabaquismo.

Abstract

Aim: To assess the influence of clinical variables of age and smoking habit on the diagnostic accuracy of subgingival proteins for detecting periodontitis.

Material and methods: Gingival crevicular fluid (GCF) samples were collected from 44 periodontally healthy subjects and 40 with periodontitis stages III-IV. Samples were analysed using sequential window acquisition of all theoretical mass spectra (SWATH-MS) proteomic technique. Proteins were identified through the UniProt database, and their diagnostic accuracy was evaluated using the generalised additive models (GAM) package. Individual protein models obtained were calculated unadjusted and adjusted for age and smoking status (years smoking and pack-year index). Three-fold cross-validation was applied to control for overfitting of the predictive models, and the classification parameters were calculated.

Results: Eight proteins were evaluated (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [GAPDH], keratin, type II cytoskeletal 6A, zymogen granule protein 16 homolog B [ZG16B], plasma protease inhibitor C1, carbonic anhydrase 1, and haemoglobin subunits [Hbs] alpha, beta, and delta). Unadjusted models showed accuracy (ACC) of 64.3-91.7% (sensitivity/specificity of 42.5-95.0%/68.2-88.6%). Adjustment for age consistently improved diagnostic performance across all proteins (ACC: 88.1-96.4%; sensitivity/specificity: 87.5-97.5%/81.8-97.7%). According to smoking habit, performance improved for six proteins (ACC: 81.0-92.9%; sensitivity/specificity: 67.5-95.0%/72.7-93.2%), but decreased for GAPDH considering years smoking and pack-year index (ACC: 71.4% and 85.7%; sensitivity/specificity: 72.5% and 87.5%/70.5% and 84.1%) and for Hb beta considering years of smoking (ACC: 72.6%; sensitivity/specificity: 57.5%/86.4%).

Conclusions: Age and smoking habit affect the diagnostic accuracy of subgingival proteins biomarkers for periodontitis. Age exerts a more consistent and systematic influence, allowing to achieve exceptional predictive values. The impact of smoking is more variable and biomarker dependent. However, these results must be validated in future research.

Keywords: periodontitis, biomarkers, gingival crevicular fluid, proteomics, SWATH-MS, age, smoking.

1. Introducción

La periodontitis es una afección inflamatoria que afecta a las estructuras de soporte de los dientes (la encía, el hueso alveolar y el ligamento periodontal) (1). Se desarrolla a partir de la gingivitis, caracterizada por la inflamación de la encía inducida por la acumulación de placa bacteriana, progresando hacia una afección destructiva e irreversible, con pérdida de inserción periodontal y hueso alveolar, que puede provocar la pérdida del diente (2).

Diversos patógenos bacterianos han sido asociados con el inicio y la progresión de la enfermedad periodontal (3). Estos microorganismos desencadenan una respuesta inmunoinflamatoria excesiva del huésped que conducen a la destrucción de los tejidos de soporte del diente (2). Más allá de su impacto en la salud bucodental, la periodontitis ha demostrado repercutir en el estado sistémico de forma bidireccional (4). De hecho, más de 50 enfermedades sistémicas han demostrado estar relacionadas con la periodontitis como la diabetes mellitus, la artritis reumatoide, la aterosclerosis, la enfermedad de Alzheimer e incluso el cáncer (5,6).

Actualmente, las enfermedades periodontales son una de las condiciones orales más prevalentes a nivel global, representando un preocupante problema de salud pública (7). Se estima que alrededor del 62% de la población adulta mundial presenta periodontitis en diversos estadios, siendo severa en el 24% de los casos (8). Similarmente, en España, un 60% de la población entre 35 y 74 años presentan bolsas periodontales de acuerdo con los últimos datos de la Encuesta de Salud Oral (9).

Sin embargo, la susceptibilidad individual a desarrollar periodontitis varía considerablemente, influida por múltiples factores de riesgo (10). Estos se clasifican en modificables, como el tabaquismo y el consumo de alcohol, y no modificables, como la edad y la predisposición genética (11).

Entre los factores modificables, el tabaquismo se considera el principal determinante de riesgo para la enfermedad periodontal (12). El tabaco altera la respuesta inmunitaria, la microbiota y la capacidad de regeneración del periodonto (13). Microbiológicamente, influye en la ecología periodontal observándose diferente abundancia relativa y prevalencia de diversos patógenos periodontales como *Fusobacterium*, *Eubacterium* o *Capnocytophaga* (14). Inmunológicamente, el tabaco exacerba las respuestas inflamatorias patológicas, pero también atenúa su función defensiva normal persistiendo incluso tras dejar de fumar (15,16).

Entre los factores de riesgo no modificables, destaca la edad. El envejecimiento se asocia no sólo con una posible disminución en la eficacia de la higiene bucal, resultando en mayores niveles de placa dental (2), sino también a un deterioro en la respuesta inmunitaria e inflamatoria contribuyendo a la destrucción de los tejidos periodontales (17).

En este contexto, las técnicas proteómicas han permitido caracterizar con mayor detalle el proteoma del fluido gingival crevicular (FGC), revelando que se ve significativamente alterado tanto por la edad como por el hábito tabáquico, incluyendo incluso a sujetos exfumadores (18,19).

Considerando las diferentes técnicas proteómicas desarrolladas durante los últimos años, destaca el método “sequential window acquisition of all theoretical mass spectra” (SWATH-MS), especialmente para la identificación de nuevos biomarcadores proteicos (20). Este enfoque sin marcaje (en inglés “label-free”) resulta más económico, presenta una preparación de muestras más sencilla y permite analizar cohortes de mayor tamaño que las técnicas con marcaje (20). Además, SWATH-MS integra una estrategia de adquisición dependiente de datos (en inglés “data dependent acquisition”, DDA) para la identificación de proteínas, con una adquisición independiente de datos (en inglés “data independent acquisition”, DIA) no dirigida, para la cuantificación (21).

La estrategia DDA permite una amplia cobertura del proteoma, aunque presenta limitaciones en la detección de proteínas presentes en bajas concentraciones. En contraste, las metodologías DIA, tanto no dirigidas como dirigidas, ofrecen una mayor sensibilidad y precisión en la cuantificación de proteínas (22). Mientras que la DIA no dirigida es ideal para el descubrimiento de nuevos biomarcadores, la DIA dirigida se utiliza para cuantificaciones más exactas, sensibles y específicas (23). En el enfoque SWATH-MS, la DDA se emplea inicialmente para generar una biblioteca espectral de alta calidad, elemento clave para una posterior correcta cuantificación mediante DIA no dirigida. En conjunto, SWATH-MS proporciona una cobertura proteómica profunda con una reproducibilidad similar al método DDA y una precisión cuantitativa comparable al enfoque DIA dirigido (21).

Previamente, la técnica SWATH-MS ha sido empleada para estudiar el proteoma periodontal en FGC y en saliva, hallando que la periodontitis altera la expresión de numerosas proteínas (24). Además, también ha permitido identificar biomarcadores con alta precisión diagnóstica para detectar la periodontitis en ambos fluidos orales (25,26), demostrándose que

tanto la edad como el hábito tabáquico influyen en la predictividad de las proteínas salivales (26). Sin embargo, hasta la fecha, ningún estudio ha determinado el impacto de ambas variables en los biomarcadores del FGC.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio transversal fue determinar la influencia de las variables clínicas de edad y hábito tabáquico en la capacidad predictiva de los biomarcadores del FGC para diagnosticar la periodontitis.

2. Material y métodos

2.1. Sujetos de estudio y variables clínicas de interés

Una muestra de conveniencia de 90 participantes elegibles, compuesta por 45 sujetos periodontalmente sanos (grupo control) y 45 individuos afectados por periodontitis no tratada (grupo periodontitis), se reclutó entre 2024 y 2025 en la Unidad Clínica y de Investigación en Pacientes con Necesidades Especiales en la Facultad de Medicina y Odontología (Universidad de Santiago de Compostela, España). Seis de los 90 sujetos fueron excluidos por incumplimiento de las fases del proyecto. Por lo tanto, los grupos clínicos quedaron finalmente compuestos por 44 sujetos periodontalmente sanos y 40 pacientes con periodontitis.

Se seleccionaron pacientes que cumplieran los siguientes criterios de inclusión: 1) entre 20 y 75 años; 2) presencia de al menos 10 dientes naturales; 3) no haber recibido tratamiento periodontal previo; 4) no presentar enfermedades sistémicas; 5) no haber tomado antibióticos sistémicos en los seis meses anteriores; 6) no haber tomado antiinflamatorios en los cuatro meses anteriores; 7) no uso de antisépticos orales de forma rutinaria; 8) no antecedentes de abuso de alcohol o drogas; 9) no embarazo ni en periodo de lactancia; y 10) no uso de aparatos de ortodoncia.

Dos odontólogos experimentados y previamente calibrados realizaron los diagnósticos periodontales (coeficiente de correlación intraclase [CCI] >0,950). El sangrado al sondaje (SS) y el nivel de placa bacteriana (NPB) se registraron para toda la boca en una escala binaria (presencia/ausencia) en seis puntos por diente. La profundidad de la bolsa de sondaje (PS) y la pérdida de inserción clínica (PIC) se registraron con una sonda PCP-UNC 15 en seis puntos por diente. La PS se midió como la distancia desde el margen gingival hasta la base del surco gingival. Se evaluó un valor positivo de recesión gingival (REC) para el desplazamiento apical

del margen gingival en relación con la unión cemento-esmalte. Considerando una anchura biológica (AB) media de 2 mm (27), se definió PIC según tres supuestos: (1) PS <4 mm y REC de 0 mm, PIC fue igual a 0 mm; (2) PS \geq 4 mm y REC de 0 mm, PIC fue igual a PS restando AB; y (3) PS \geq 4 mm y REC >0 mm, PIC fue PS más REC.

Se realizaron radiografías dentales normalizadas para evaluar el estado del hueso alveolar. El diagnóstico de periodontitis se basó en la información clínica y radiográfica obtenida. El grupo de control incluyó sujetos periodontalmente sanos según los criterios de la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales (28,29), es decir, SS <10%, ninguna localización con una PS \geq 4 mm y ninguna evidencia radiográfica de pérdida ósea alveolar. Esta clasificación también se utilizó para el grupo de periodontitis, compuesto por pacientes diagnosticados de periodontitis generalizada en estadios III o IV y grados B o C.

El hábito tabáquico de los participantes se evaluó mediante un cuestionario recogiendo información sobre su grado (no fumador, exfumador o fumador actual), tiempo como exfumador o fumador actual y número de cigarrillos consumidos al día. Se consideraron no fumadores los que nunca habían fumado, fumadores actuales los que llevaban fumando al menos un año, y exfumadores los que habían dejado de hacerlo al menos un año antes, independientemente del tiempo que llevaran fumando.

La investigación se llevó a cabo siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki (revisada en 2013) sobre estudios de experimentación humana (30). El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (número de registro 2021/417) (Apéndice S1). Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito para su participación en el estudio.

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

Se recogieron muestras de FGC de cada paciente en los primeros 7-14 días después de la exploración intraoral agrupándose a partir de cinco sitios proximales no adyacentes. Las muestras se tomaron de dientes de los cuadrantes 1 y 3 en los controles periodontalmente sanos. En los pacientes con periodontitis, se recogieron de los sitios con mayor PS. Se introdujeron dos puntas de papel en la bolsa periodontal durante 30 segundos. En caso de notable contaminación con sangre, se desecharon y se tomaron nuevas muestras. Las puntas recogidas se introdujeron en tubos etiquetados con 300 ml 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 FGC se cuantificaron con el RC DC™ Protein Assay Kit (BIORAD, Hercules, California, USA). 50µg de proteínas de cada muestra fueron precipitadas utilizando el método metanol/cloroformo (MeOH/CHCl₃) para eliminar posibles contaminantes como ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o lípidos presentes en las muestras de FGC.

Las proteínas del FCG purificadas se cargaron en una banda para poder realizar la digestión "en gel" utilizando electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (en inglés "sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis", SDS-PAGE) al 10%. La electroforesis se detuvo cuando el frente penetró 3 mm en el gel 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 en un SpeedVac. 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 en un SpeedVac 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 grupos de estudio (periodontalmente sanos y con periodontitis), se prepararon "pools" de cada grupo clínico utilizando cantidades iguales de muestras digeridas individuales para construir la biblioteca espectral necesaria para el análisis SWATH-MS. El pool de péptidos digeridos se separó utilizando cromatografía líquida en fase reversa (en inglés "reversed-phase liquid-chromatography", RP-LC) y gradientes de 40 minutos.

Se utilizó un espectrómetro de masas de alta velocidad TripleTOF® 6600 (SCIEX) para la adquisición de datos mediante un flujo de trabajo DDA. Las proteínas se identificaron utilizando el software ProteinPilot™ 5.0.1. (SCIEX) frente a la base de datos UniProt específica para humanos (31) y considerando una tasa de falsos descubrimientos (en inglés "false discovery rate", FDR) ≤1% (32).

2.3.2. Cuantificación relativa

Posteriormente, las muestras se analizaron individualmente mediante un método DIA. Se examinaron como se ha descrito anteriormente, pero utilizando la estrategia SWATH-MS. Este método consiste en repetir un ciclo de adquisición de 100 barridos TOF MS/MS utilizando ventanas de aislamiento de precursores secuenciales y solapadas de anchuras variables que cubren todo el rango de masas entre 400 y 1250 m/z (en inglés “mass-to-charge ratio”), obtenido con un barrido previo TOF MS (400-1500 m/z y 50 milisegundos de tiempo de adquisición) 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 MS/MS^{ALL} de análisis SWATH 2.0 y la biblioteca espectral creada previamente. Sólo se seleccionaron los valores de área de pico integrada basados en la intensidad de la señal de 10 péptidos por proteína y siete fragmentos por péptido con un error de 30 partes por millón (ppm). Los péptidos compartidos y modificados se excluyeron del tratamiento. 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 homogeneizar los datos obtenidos, se realizó una normalización “most likely ratio” (MLR) (33).

2.4. Análisis estadístico

El cálculo del tamaño muestral de los grupos de estudio se ha realizado desde la perspectiva de la precisión diagnóstica, estimando un valor mínimo predeterminado de área bajo la curva (ABC) de 0,85 con un error marginal de 0,1 y un nivel de confianza del 95%, resulta en un tamaño muestral requerido de 40 sujetos en cada condición clínica (34).

2.4.1. Comparación de las características clínicas entre los sujetos de control y los pacientes con periodontitis

Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks para verificar la distribución de las variables, la prueba t de Student para las variables de distribución normal y la prueba U de Mann-Whitney cuando no era normal. Estas pruebas se utilizaron para comparar las variables clínicas cuantitativas entre la condición de control y la periodontitis. El test exacto de Fisher y Chi-cuadrado se utilizaron para evaluar la asociación de variables cualitativas entre las condiciones clínicas. Se estableció un nivel de significancia de $p < 0,05$.

2.4.2. Análisis de modelos predictivos de diagnóstico

Para la modelización predictiva se consideraron los biomarcadores subgingivales identificados previamente mediante SWATH-MS (25). Los sujetos periodontalmente sanos se consideraron como la “condición de control” y la “condición objetivo” comprendía a los pacientes con periodontitis. Los modelos obtenidos fueron de una única proteína sin ajustar y ajustada por edad y hábito tabáquico.

Considerando el tabaco, se ha demostrado que la duración del tabaquismo por sí sola proporciona estimaciones de riesgo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) más sólidas que el índice compuesto de paquete-año (35). Con respecto a los exfumadores, los sujetos que dejaron de fumar hace ≤ 2 años tienen la misma probabilidad de tener periodontitis que los fumadores. El riesgo de periodontitis tras ≥ 11 años sin fumar es el mismo que en los no fumadores (36). En base a estas consideraciones, la variable tabaquismo se analizó de dos formas, considerando: 1) años fumando solamente, y 2) años fumando junto con cigarrillos fumados (índice paquete-año). En ambos análisis se introdujo un factor de corrección para los exfumadores, de forma que cuantos más años hubiera dejado de fumar el sujeto, menor sería el impacto del factor tabaquismo.

Para los años de tabaquismo la fórmula aplicada fue:

$$\frac{\text{Años fumando}}{\frac{\text{Años sin fumar}}{5} + 1}$$

Para los años fumando y el número de cigarrillos (índice paquete-año), la fórmula aplicada fue:

$$\frac{\frac{\text{Número de cigarrillos al día} \times 365}{20} \times \text{Años fumando}}{\frac{\text{Años sin fumar}}{5} + 1}$$

Los análisis se realizaron con el programa informático R (versión 4.2.2) (37) y se siguieron las recomendaciones de modelización predictiva de las directrices TRIPOD (38).

Los datos de las proteínas cuantificadas (valores de área de pico integrados tras la normalización MLR) se transformaron logarítmicamente.

Se desarrollaron modelos predictivos de las proteínas utilizando el paquete de modelos aditivos generalizados (en inglés “generalised additive models”, GAM) (versión 1.22) (39). Este paquete emplea un modelo paramétrico combinado y técnicas de suavizado utilizando un algoritmo de ajuste posterior. La metodología GAM generaliza los modelos lineales clásicos al permitirles considerar distribuciones no gaussianas de las variables de respuesta y estimar relaciones no lineales entre las variables predictoras y la variable objetivo, incorporando funciones de suavizado (40,41).

El umbral de clasificación para el valor de máxima precisión (PRE) se determinó utilizando el paquete InformationValue (versión 1.2.3) (42). El término precisión (exactitud, *accuracy*) corresponde a la proporción de predicciones correctas, incluyendo verdaderos positivos y verdaderos negativos, respecto al total de casos analizados. Las medidas de clasificación PRE, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), odds ratio diagnóstica (ORD) y sus intervalos de confianza (IC) del 95% se calcularon mediante el paquete pROC (versión 1.18.0) (43). Este paquete también se utilizó para calcular el ABC y sus IC del 95%. Las curvas características operativas del receptor (en inglés “receiver operating characteristic”, ROC) se construyeron con el paquete Epi (versión 2.47) (44). Con el objetivo de evaluar el sobreajuste de los modelos obtenidos, se aplicó un enfoque de validación cruzada (en inglés “cross-validation”) con tres particiones.

3. Resultados

3.1. Características clínicas

Los sujetos con periodontitis fueron significativamente mayores que los del grupo periodontal sano. El número de no fumadores, fumadores y exfumadores difirió significativamente entre los grupos clínicos. Además, los pacientes con periodontitis llevaban más tiempo fumando que los del grupo control, pero sin diferencias significativas en el número de cigarrillos consumidos al día.

En cuanto a los parámetros clínicos de toda la boca, los valores de NPB, SS, PS y PIC fueron significativamente superiores en los sujetos con periodontitis que en los sujetos de control; asimismo, los niveles de SS, PS y PIC de las zonas muestreadas fueron significativamente superiores en los pacientes con periodontitis (Tabla 1).

3.2. Proteínas cuantificadas por SWATH-MS

La biblioteca espectral *in silico* creada estuvo compuesta por 37.985 transiciones, 4.556 péptidos y 427 proteínas. De ellas, 250 proteínas se cuantificaron mediante SWATH-MS utilizando los criterios definidos previamente.

Tabla 1. Edad, sexo, hábito tabáquico y características clínicas de los pacientes seleccionados asociados al estado periodontal en el grupo de control y de periodontitis

| Parámetros clínicos | Grupos de estudio | | |
|---|--------------------------|----------------------|---------|
| | Grupo control (n=44) | Periodontitis (n=40) | Valor p |
| Edad, años | 31,86 ± 10,26 | 53,90 ± 10,20 | <0,001* |
| Género | | | |
| No. Masculino | 17 | 20 | NS |
| No. Femenino | 27 | 20 | |
| Hábito tabáquico | | | |
| No. Pacientes no fumadores | 27 | 13 | 0,006 |
| No. Pacientes fumadores | 15 | 17 | |
| No. Pacientes exfumadores | 2 | 10 | |
| No. Cigarrillos/día | 11,26 ± 7,49 | 16,87 ± 10,45 | NS* |
| No. Pacientes <10 cigarrillos/día | 7 | 7 | NS |
| No. Pacientes 10-20 cigarrillos/día | 8 | 14 | |
| No. Pacientes >20 cigarrillos/día | 2 | 6 | |
| No. Años fumando | 11,75 ± 6,67 | 28,89 ± 10,83 | <0,001 |
| No. Pacientes <5 años fumando | 2 | 1 | NS |
| No. Pacientes ≥5 años fumando | 15 | 26 | |
| No. Años sin fumar | 7,00 ± 2,83 | 7,50 ± 6,10 | NS* |
| No. Pacientes <5 años sin fumar | 0 | 4 | NS |
| No. Pacientes ≥5 años sin fumar | 2 | 6 | |
| Estadio periodontal | | | |
| No. Pacientes estadio III | NA | 28 | NA |
| No. Pacientes estadio IV | NA | 12 | |
| Grado periodontal | | | |
| No. Pacientes grado B | NA | 17 | NA |
| No. Pacientes grado C | NA | 23 | |
| Boca completa | | | |
| No. Dientes | 27,66 ± 1,12 | 21,35 ± 4,96 | <0,001* |
| No. Zonas evaluadas | 165,95 ± 6,72 | 130,80 ± 29,34 | <0,001* |
| NPB, % | 14,23 ± 11,03 | 51,00 ± 27,49 | <0,001* |
| No. Pacientes NPB ≤30% | 39 | 8 | <0,001 |
| No. Pacientes NPB >30% | 5 | 32 | |
| SS, % | 3,98 ± 2,65 | 50,90 ± 19,42 | <0,001* |
| No. Pacientes SS <10% | 44 | 0 | <0,001 |
| No. Pacientes SS 10-30% | 0 | 6 | |
| No. Pacientes SS >30% | 0 | 34 | |
| PS, mm | 1,75 ± 0,29 | 3,60 ± 0,58 | <0,001 |
| % Zonas PS ≤3 mm | 100 ± 0,00 | 55,16 ± 17,60 | <0,001* |
| % Zonas PS 4-5 mm | 0,00 ± 0,00 | 33,31 ± 10,73 | <0,001* |
| % Zonas PS ≥6 mm | 0,00 ± 0,00 | 11,53 ± 9,22 | <0,001* |
| PIC, mm | 0,01 ± 0,03 [†] | 3,36 ± 1,82 | <0,001* |
| % Zonas PIC 0 mm | 99,77 ± 1,00 | 30,91 ± 20,99 | <0,001* |
| % Zonas PIC 1-2 mm | 0,23 ± 1,00 [†] | 12,61 ± 8,09 | <0,001* |
| % Zonas PIC 3-4 mm | 0,00 ± 0,00 | 21,90 ± 8,34 | <0,001* |
| % Zonas PIC ≥5 mm | 0,00 ± 0,00 | 34,57 ± 25,89 | <0,001* |
| Bolsas subgingivales muestreadas | | | |
| SS, % | 0,85 ± 3,19 | 87,25 ± 16,48 | <0,001* |
| PS, mm | 1,91 ± 0,40 | 6,09 ± 0,75 | <0,001* |
| PIC, mm | 0,00 ± 0,00 | 6,08 ± 1,75 | <0,001* |

Abreviaturas: No.: número; NPB: nivel de placa bacteriana; SS: sangrado al sondaje; PS: profundidad de sondaje; mm: milímetros; PIC: pérdida de inserción clínica; NA: no aplicable; NS: no significativo.

*: Test U de Mann-Whitney (variable de distribución no normal).

†: Valores PIC diferentes de 0 por razones traumáticas, no de origen periodontal.

Los valores indican las medias ± desviaciones estándar y, en algunos casos, el número de pacientes o el porcentaje de zonas. Se estableció un valor p significativo <0,05.

3.3. Modelización predictiva de las proteínas del FGC

3.3.1. Precisión diagnóstica de las proteínas del FGC sin ajustar

De las ocho proteínas seleccionadas, siete mostraron una ABC de 0,797-0,969 valores que, según Hosmer et al., se consideran de aceptables a excepcionales (45). En contraste, la subunidad de la hemoglobina (Hb) alfa mostró una ABC pobre de 0,650.

Ordenadas de mayor a menor PRE (sensibilidad/especificidad) estos biomarcadores fueron: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con un 91,7% (95,0%/88,6%), Hb beta con un 83,3% (87,5%/75,0%), queratina, tipo II citoesquelética 6A con un 82,1% (92,5%/68,2%), inhibidor de la proteasa plasmática C1 con un 81,0% (82,5%/79,6%), proteína del gránulo de zimógeno 16 homóloga B (ZG16B) con un 79,8% (82,5%/77,3%), Hb delta con un 78,6% (75,0%/79,6%), anhidrasa carbónica 1 con un 75,0% (75,0%/75,0%), y Hb alfa con un 64,3% (42,5%/84,1%) (Figuras 1-8).

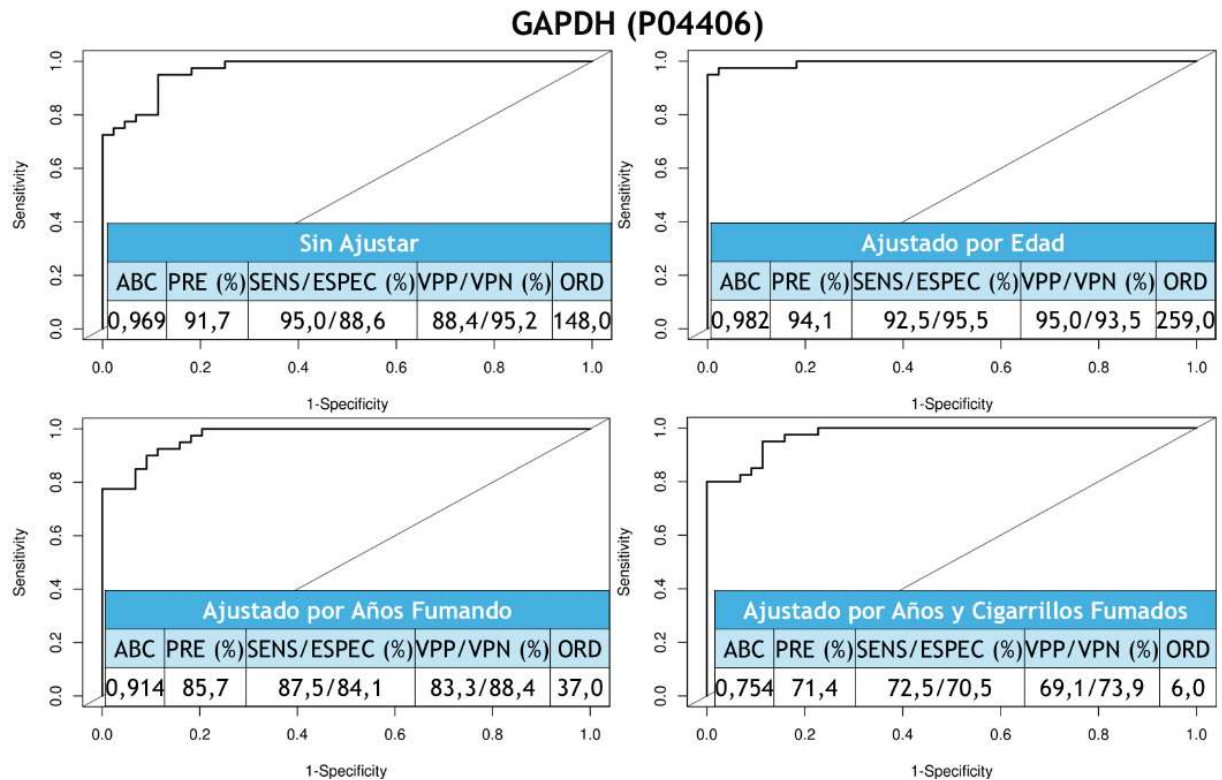


Figura 1. Curvas ROC de la GAPDH subgingival para diferenciar la periodontitis de la salud periodontal no ajustada y ajustada por edad y hábito tabáquico (años fumando y cigarrillos fumados).

Abreviaturas: GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; ABC: área bajo la curva; PRE: precisión; SENS: sensibilidad; ESPEC: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; ORD: odds ratio diagnóstica. En cada celda, el valor se refiere a las medidas de rendimiento corregidas por el nivel de optimismo, calculado mediante validación cruzada con tres particiones.

3.3.2. Precisión diagnóstica de las proteínas del FGC ajustadas por edad

La precisión diagnóstica de todos estos biomarcadores aumentó cuando se tuvo en cuenta la edad, demostrando valores excepcionales de ABC de 0,948-0,990 (45). La PRE incrementó a 88,1-96,4% (sensibilidad/especificidad de 87,5-97,5%/81,8-97,7%) representando una mejora entre el 2,4% para la GAPDH hasta un 26,2% para la Hb alfa, debido a un aumento de la sensibilidad del 55% (Figuras 1 y 8).

Las proteínas ajustadas por edad ordenadas de mayor a menor PRE (sensibilidad/especificidad) fueron: inhibidor de la proteasa plasmática C1 con un 96,4% (97,5%/95,5%), GAPDH con un 94,1% (92,5%/95,5%), Hb beta con 92,9% (87,5%/97,7%), queratina tipo II citoesquelética 6A, y Hbs alfa y delta las tres con un 90,5% (95,0%/84,1% y 97,5%/84,1% para las dos Hbs), y ZG16B y anhidrasa carbónica 1 ambas con 88,1% (95,0%/81,8% para ambas).

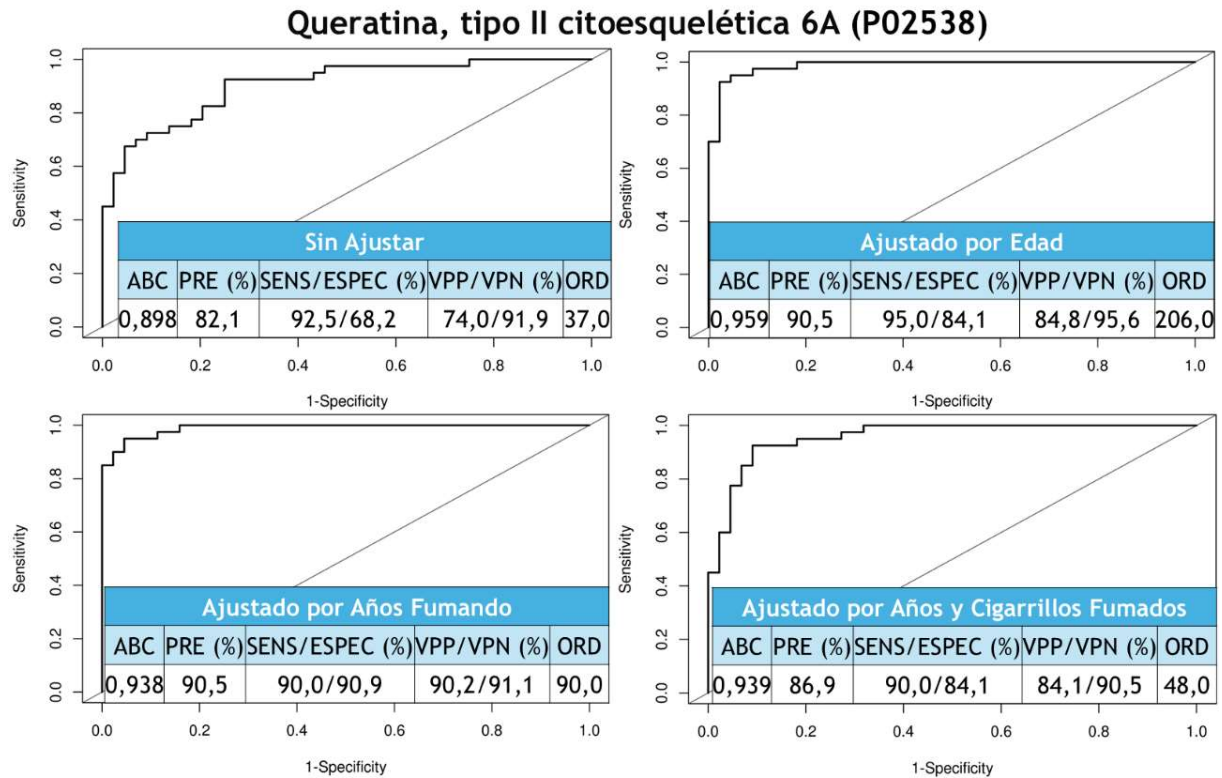


Figura 2. Curvas ROC de la queratina, tipo II citoesquelética 6A subgingival para diferenciar la periodontitis de la salud periodontal no ajustada y ajustada por edad y hábito tabáquico (años fumando y cigarrillos fumados).

Abreviaturas: ABC: área bajo la curva; PRE: precisión; SENS: sensibilidad; ESPEC: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; ORD: odds ratio diagnóstica.
En cada celda, el valor se refiere a las medidas de rendimiento corregidas por el nivel de optimismo, calculado mediante validación cruzada con tres particiones.

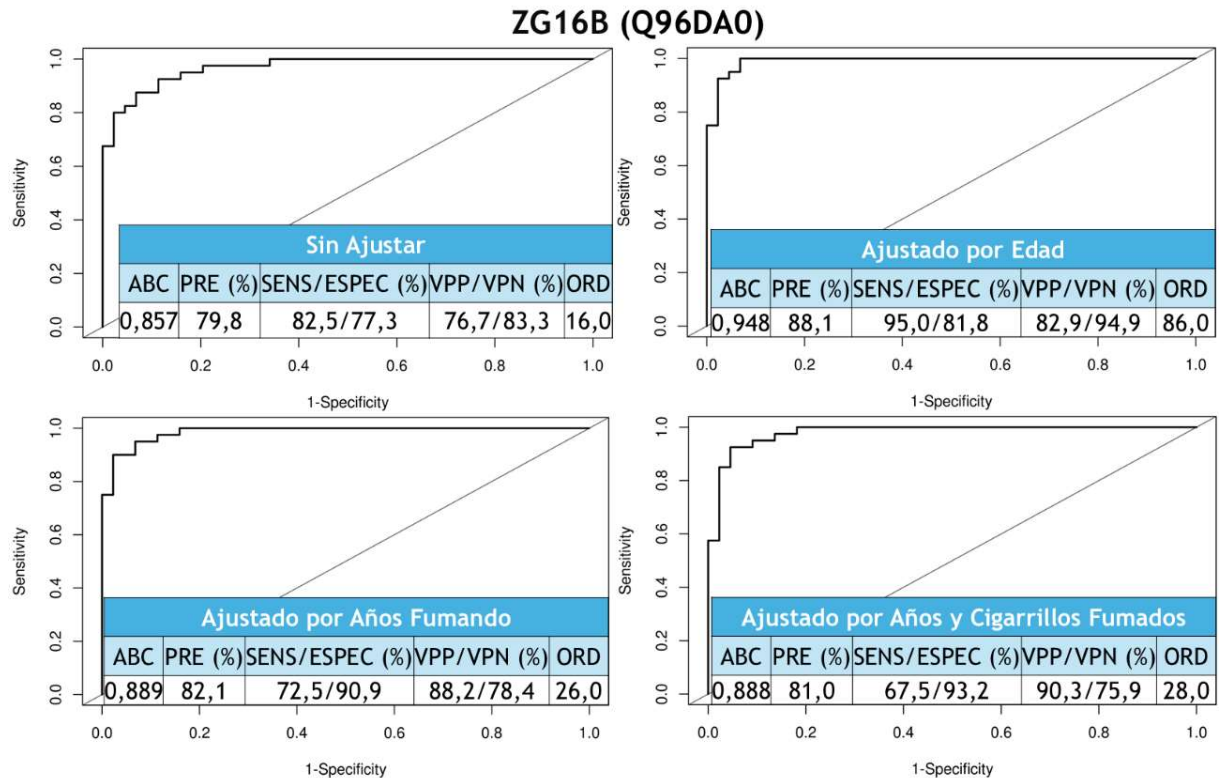


Figura 3. Curvas ROC de la ZG16B subgingival para diferenciar la periodontitis de la salud periodontal no ajustada y ajustada por edad y hábito tabáquico (años fumando y cigarrillos fumados).

Abreviaturas: ZG16B: proteína del gránulo de zimógeno 16 homóloga B; ABC: área bajo la curva; PRE: precisión; SENS: sensibilidad; ESPEC: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; ORD: odds ratio diagnóstica. En cada celda, el valor se refiere a las medidas de rendimiento corregidas por el nivel de optimismo, calculado mediante validación cruzada con tres particiones.

3.3.3. Precisión diagnóstica de las proteínas del FGC ajustadas por hábito tabáquico

Considerando el hábito tabáquico, los valores predictivos también incrementaron obteniéndose resultados similares entre los años fumando y el índice paquete-año. La ABC osciló desde valores aceptables a excepcionales de 0,754-0,980 y 0,754-0,955 (45), con una PRE de 72,6-92,9% (sensibilidad de 57,5-95,0%/especificidad de 72,7-90,9%) y 71,4-91,7% (67,5-92,5%/70,5-93,2%), respectivamente.

Esto supuso incremento de la PRE entre el 2,3-28,6% (años fumando) y 1,2-27,4% (índice paquete-año), correspondiendo en ambas comparativas el valor más bajo a la ZG16B y Hb alfa el más elevado (Figuras 3 y 8). Las excepciones fueron la GAPDH con una disminución de la PRE considerando los años de tabaquismo (-6,0%) y el índice paquete-año (-20,3%), así como la Hb beta con una reducción de la PRE considerando los años fumando (-10,7%) (Figuras 1 y 6).

Cabe destacar que seis de los ocho biomarcadores presentaron valores de PRE más altos teniendo en cuenta los años de tabaquismo. Ordenados de mayor a menor PRE

(sensibilidad/especificidad), estos fueron: Hb alfa con 92,9% (95,0%/90,9%), queratina, tipo II citoesquelética 6A y Hb delta ambas con 90,5% (90,0%/90,9% y 85,0%/90,9% respectivamente), inhibidor de la proteasa plasmática C1 con 86,9% (90,0%/81,8%), GAPDH con 85,7% (87,5%/84,1%) y ZG16B con 82,1% (72,5%/90,9%) (Figuras 1-4, 7 y 8). Por lo tanto, si comparamos los años de tabaquismo con respecto al índice de paquete-año, la PRE aumentó en 1,1-14,3% con una mejora de la sensibilidad y especificidad hasta el 15,0% y el 13,6%, respectivamente.

Por otro lado, la anhidrasa carbónica 1 y la Hb beta presentaron mejores valores ajustando por el índice paquete-año, con una PRE del 89,3% (87,5%/90,9%) y 88,1% (85,0%/79,6%), respectivamente (Figuras 5 y 6). Si comparamos el índice paquete-año con el número de años fumando, supuso un incremento de la PRE del 7,2% para la primera, debido a un aumento en la especificidad del 18,2%, y del 15,5% para la segunda, en este caso atribuido a una ganancia del 27,5% en la sensibilidad.

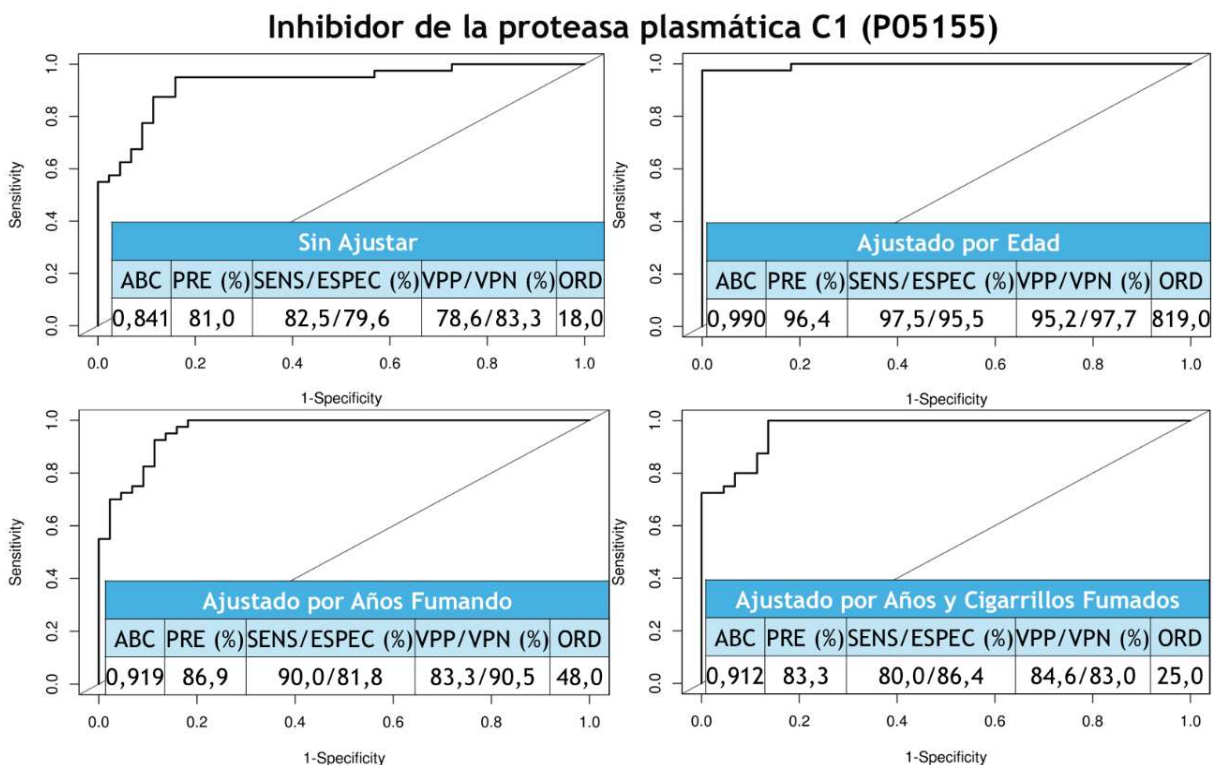


Figura 4. Curvas ROC del inhibidor de la proteasa plasmática C1 subgingival para diferenciar la periodontitis de la salud periodontal no ajustada y ajustada por edad y hábito tabáquico (años fumando y cigarrillos fumados).

Abreviaturas: ABC: área bajo la curva; PRE: precisión; SENS: sensibilidad; ESPEC: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; ORD: odds ratio diagnóstica.
En cada celda, el valor se refiere a las medidas de rendimiento corregidas por el nivel de optimismo, calculado mediante validación cruzada con tres particiones.

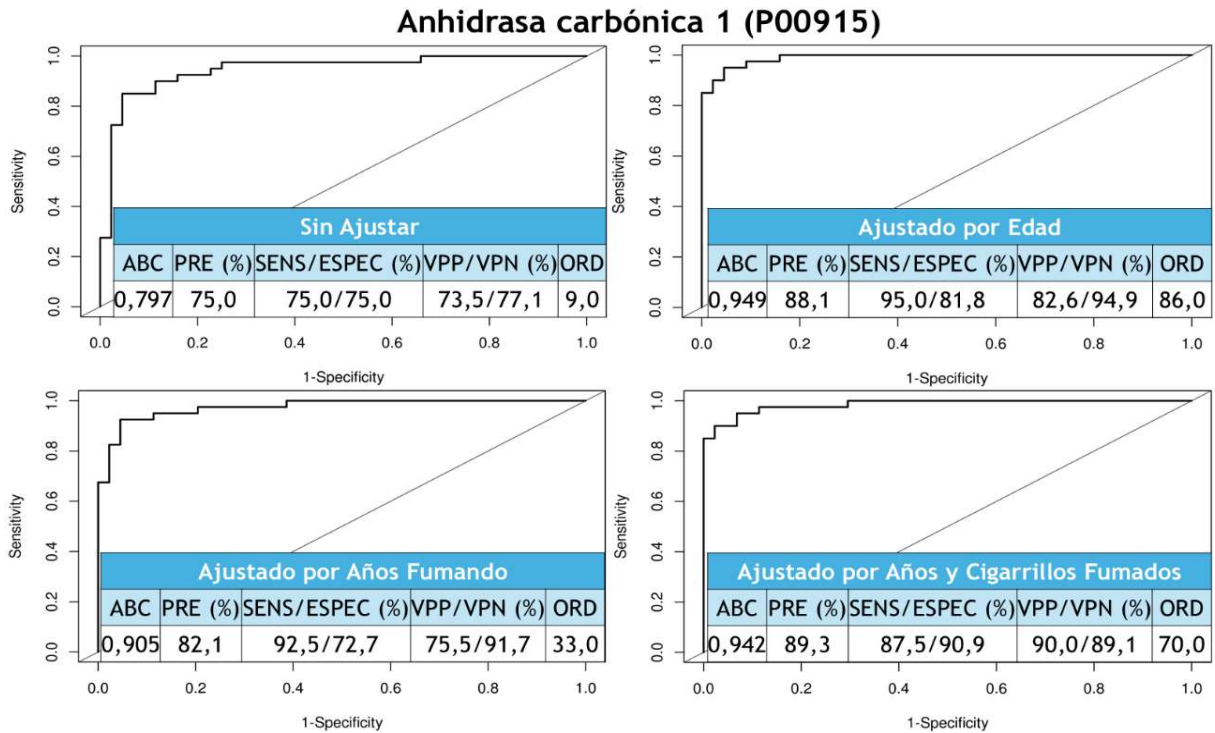


Figura 5. Curvas ROC de la anhidrasa carbónica 1 subgingival para diferenciar la periodontitis de la salud periodontal no ajustada y ajustada por edad y hábito tabáquico (años fumando y cigarrillos fumados).

Abreviaturas: ABC: área bajo la curva; PRE: precisión; SENS: sensibilidad; ESPEC: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; ORD: odds ratio diagnóstica.
En cada celda, el valor se refiere a las medidas de rendimiento corregidas por el nivel de optimismo, calculado mediante validación cruzada con tres particiones.

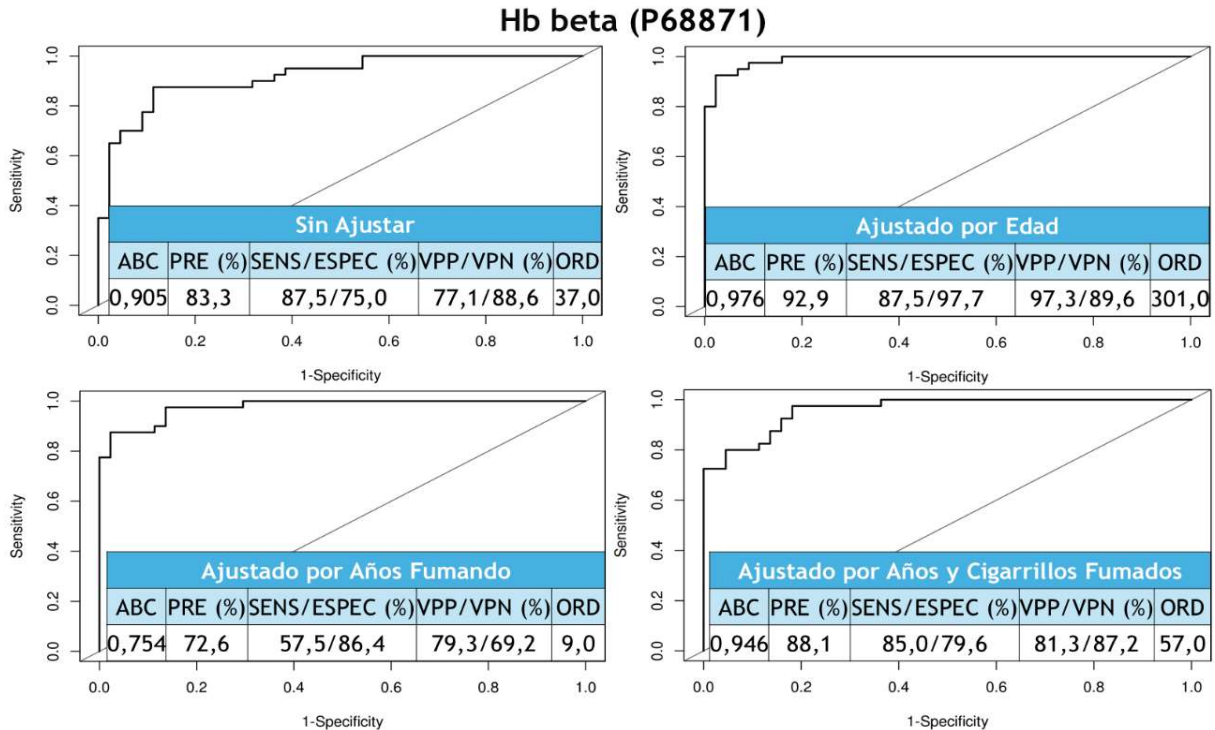


Figura 6. Curvas ROC de la Hb beta subgingival para diferenciar la periodontitis de la salud periodontal no ajustada y ajustada por edad y hábito tabáquico (años fumando y cigarrillos fumados).

Abreviaturas: Hb: subunidad de la hemoglobina; ABC: área bajo la curva; PRE: precisión; SENS: sensibilidad; ESPEC: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; ORD: odds ratio diagnóstica.
En cada celda, el valor se refiere a las medidas de rendimiento corregidas por el nivel de optimismo, calculado mediante validación cruzada con tres particiones.

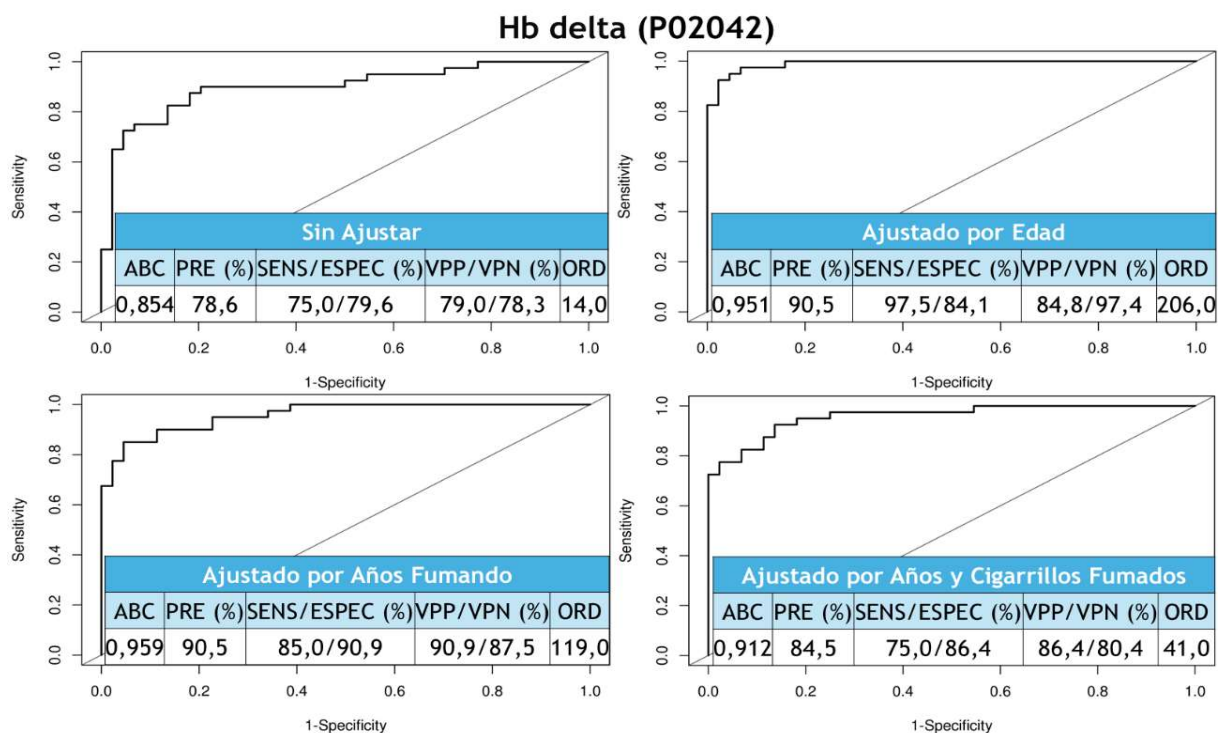


Figura 7. Curvas ROC de la Hb delta subgingival para diferenciar la periodontitis de la salud periodontal no ajustada y ajustada por edad y hábito tabáquico (años fumando y cigarrillos fumados).

Abreviaturas: Hb: subunidad de la hemoglobina; ABC: área bajo la curva; PRE: precisión; SENS: sensibilidad; ESPEC: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; ORD: odds ratio diagnóstica.
En cada celda, el valor se refiere a las medidas de rendimiento corregidas por el nivel de optimismo, calculado mediante validación cruzada con tres particiones.

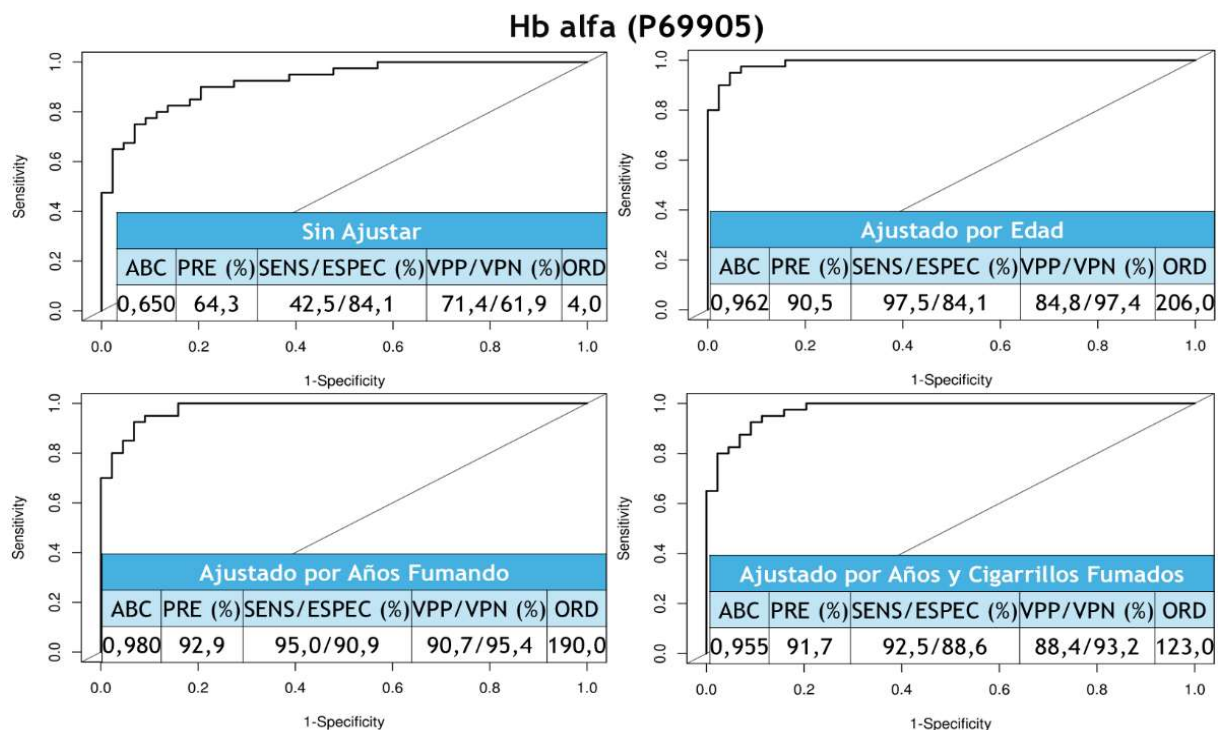


Figura 8. Curvas ROC de la Hb alfa subgingival para diferenciar la periodontitis de la salud periodontal no ajustada y ajustada por edad y hábito tabáquico (años fumando y cigarrillos fumados).

Abreviaturas: Hb: subunidad de la hemoglobina; ABC: área bajo la curva; PRE: precisión; SENS: sensibilidad; ESPEC: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; ORD: odds ratio diagnóstica.
En cada celda, el valor se refiere a las medidas de rendimiento corregidas por el nivel de optimismo, calculado mediante validación cruzada con tres particiones.

4. Discusión

El modelado predictivo de ocho biomarcadores del FGC demostraron valores de PRE que oscilaron entre el 64% y el 92% para diagnosticar la periodontitis. Esta variabilidad se relacionó con la marcada divergencia entre la sensibilidad y la especificidad de las proteínas, mostrando valores desde pobres (42,5% y 68%, respectivamente) hasta excelentes o buenos (95% y 89%, respectivamente) (46). Ajustándose por el hábito tabáquico (considerando tanto los años fumando como el índice paquete-año), la PRE aumentó en seis de estos biomarcadores, alcanzando valores >81%. Las sensibilidades y especificidades variaron desde justas (67,5% y 73%, respectivamente) hasta excelentes (95% y 93%, respectivamente) para estas proteínas (46). Sin embargo, la edad incrementó los parámetros de clasificación para todas las proteínas obteniéndose en este caso, una PRE >88% con sensibilidades sobresalientes (87,5-97,5%) y especificidades desde buenas (82%) hasta excepcionales (98%) (46).

4.1. Precisión diagnóstica de los biomarcadores subgingivales sin ajustar y relación con la periodontitis

En la Tabla 2 están recogidas las funciones generales y su posible relación con la periodontitis de los ocho biomarcadores subgingivales evaluados en este estudio.

Tabla 2. Funciones generales y relacionadas con la patogénesis de la periodontitis de las proteínas subgingivales evaluadas.

| Dif expresión (24)* | Nombre de la proteína | Función | Posible relación con la periodontitis |
|---------------------|--|---|--|
| SUB | GAPDH | Glucólisis (47) | Complejo GAIT (48); Regulador de TRAF2 (49) |
| | Queratina, tipo II citoesquelética 6A | Cicatrización (50) | Mantener integridad del epitelio (51) |
| | ZG16B | Progresión tumor pancreático (52) | Homeostasis microbioma oral (53) |
| SOBRE | Inhibidor de la proteasa plasmática C1 | Regula activación complemento (54) | Actividad antiinflamatoria (55) |
| | Anhidrasa carbónica 1 | Hidratación reversible del CO ₂ (56) | Regulación del pH (57) |
| | Hb alfa | Transporte de oxígeno (58) | Sangrado por inflamación (59); Degradación por <i>P. gingivalis</i> (60) |
| | Hb beta | | |
| Hb delta | | | |

* Diferencia de expresión en la periodontitis con respecto a la salud periodontal demostrada en estudio previo (24). SUB indica menor expresión en la periodontitis vs salud periodontal, SOBRE indica mayor expresión en la periodontitis vs salud periodontal
 Abreviaturas: CO₂: dióxido de carbono; GAIT: gamma interferon-activated inhibitor of translation; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; Hb: subunidad de la hemoglobina; *P. Porphyromonas*; TRAF2: tumour necrosis factor receptor-associated factor 2; ZG16B: proteína del gránulo de zimógeno 16 homóloga B.

Sin ajustar por ninguna variable clínica, la GAPDH fue la proteína con los mejores valores de precisión diagnóstica, en línea con resultados previos (25). Este biomarcador fue el único que mostró una PRE superior al 90%, alcanzando los valores más altos tanto en sensibilidad

como en especificidad (95% y 89%, respectivamente). La GAPDH es una enzima glucolítica (47), pero también se ha señalado su posible rol en el sistema inmunológico del huésped. Por un lado, forma parte del complejo inhibidor de la traducción activado por interferón gamma (en inglés “gamma interferon-activated inhibitor of translation”, GAIT), el cual actúa como un mecanismo antiinflamatorio (48,61). Por otro lado, ciertos patógenos pueden inhibir la capacidad de la GAPDH como regulador del factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (en inglés “tumour necrosis factor receptor-associated factor 2”, TRAF2), el cual interviene en la activación de factores clave en la respuesta inflamatoria (49) Dado que previamente se ha reportado que la GAPDH está subexpresada en el FGC en los sujetos con periodontitis (24), esta alteración podría contribuir a una respuesta inflamatoria más sostenida o descontrolada, consistente con la etiopatogénesis de la periodontitis.

Además de la GAPDH, la queratina, tipo II citoesquelética 6A y la ZG16B subgingivales también han demostrado estar menos expresadas en la periodontitis (24). La queratina mostró una PRE ligeramente superior (82% vs 80%) relacionada con una mayor sensibilidad (92,5% vs 82,5%), mientras que la ZG16B mostró una mayor especificidad (77%), siendo este valor pobre para la queratina (68%) (46). Las queratinas desempeñan un papel esencial en la inmunidad innata manteniendo la barrera epitelial. En la periodontitis, se producen alteraciones estructurales e inflamatorias dañando la integridad del epitelio gingival y favoreciendo la invasión bacteriana (51). Aunque la relación de la ZG16B con la periodontitis no está completamente esclarecida, se ha propuesto su implicación en el mantenimiento de la homeostasis del microbioma oral mediante la unión y eliminación de bacterias comensales (53).

El inhibidor de la proteasa plasmática C1 demostró una excelente capacidad para diagnosticar la periodontitis (sensibilidad del 82,5%) y buena para diferenciar la salud periodontal (especificidad del 80%) (46). A diferencia de las proteínas anteriores, este biomarcador se encontró sobreexpresado en la periodontitis (24). Su incremento podría reflejar un intento del hospedador por contrarrestar el desequilibrio inflamatorio, ya que regula la activación del sistema del complemento y de proteasas inflamatorias, ejerciendo una función antiinflamatoria (54,55).

La anhidrasa carbónica 1 presentó una buena sensibilidad y justa especificidad con un 75% para ambos parámetros de clasificación (46). Aunque se desconoce su relación directa con la periodontitis, se ha señalado que esta enzima, presente en las células inmunitarias

polimorfonucleares, podría participar en la regulación del pH local mediante la producción de bicarbonato. Este bicarbonato favorece la alcalinización del entorno, el cual ha sido vinculado con estadios avanzados de periodontitis y respaldaría su sobreexpresión en la periodontitis (24,57).

En cuanto a las Hbs alfa, beta y delta se observaron diferencias relevantes entre ellas en cuanto a su rendimiento diagnóstico. Previamente, las tres subunidades fueron halladas sobreexpresadas en la periodontitis (24), relacionado con el mayor sangrado gingival espontáneo a pesar de descartarse las muestras notablemente contaminadas por sangre (59). Además, bacterias periodontopatógenas como la *Porphyromonas gingivalis* han desarrollado mecanismos para capturar y degradar la hemoglobina, liberando subunidades durante el proceso pudiéndose detectar en el FGC (60). Sin embargo, mientras la PRE fue similar para las Hbs beta y delta entorno al 80%, la Hb alfa demostró la menor PRE (64%) relacionada con una sensibilidad marcadamente baja (42,5%). Esta discrepancia podría deberse a una mayor variabilidad interindividual en los niveles de Hb alfa.

4.2. Influencia de las variables clínicas de edad y hábito tabáquico en la capacidad predictiva de los biomarcadores subgingivales

Ajustándose la precisión diagnóstica de las proteínas de acuerdo con la edad, se produjo un incremento de la PRE de todos los biomarcadores entre 2-26% mostrando valores excelentes de sensibilidad >87% y buena especificidad >81% (46). El inhibidor de la proteasa plasmática C1 obtuvo la mejor capacidad predictiva con valores de sensibilidad y especificidad >95%, seguida de la GAPDH con resultados >92%.

Cabe destacar que la Hb alfa fue la proteína que mostró el mayor incremento en la PRE alcanzando un valor de 90,5%. Como se mencionó previamente, la sensibilidad de la Hb alfa fue extremadamente baja; sin embargo, al considerarse la edad, este parámetro aumentó en un 55%, superando el 97%. Si bien la precisión diagnóstica de las otras Hbs, beta y delta, también mejoró al ajustarse por edad, los incrementos fueron de menor magnitud, obteniéndose valores de PRE similares a la Hb alfa (93% y 90,5%, respectivamente). En consecuencia, la edad actúa como una variable influyente en las Hbs, siendo particularmente relevante en el caso de la Hb alfa.

La influencia de la edad puede estar relacionado con los cambios inmunológicos asociados al envejecimiento, conocidos como “inmunosenescencia”, que comprometen la capacidad del

individuo para responder a infecciones. Este proceso se asocia frecuentemente con un estado proinflamatorio crónico, denominado con el término en inglés “inflammaging” (62). En el contexto periodontal, este fenómeno se manifiesta en una respuesta inmune alterada y menos efectiva, produciendo alteraciones en el proteoma periodontal relacionadas con el progreso de la periodontitis (62-64). Estos hallazgos respaldan el impacto de la edad en la precisión diagnóstica de las proteínas siendo un factor relevante en la mejora del rendimiento de los modelos predictivos.

A diferencia de la edad, el impacto del tabaco fue más heterogéneo y dependiente de la proteína considerada. En seis de las ocho proteínas la PRE aumentó entre 1-29%, aunque la sensibilidad y especificidad mostraron más variabilidad, con valores desde <70% hasta >90%. En cinco de estos biomarcadores, el número de años fumando fue un factor más relevante que la cantidad de cigarrillos fumados, observándose una diferencia de hasta un 6% en la PRE para la Hb delta, debido a una mayor sensibilidad y especificidad (85% vs 75% y 91% vs 86%, respectivamente).

No obstante, en el caso de la anhidrasa carbónica 1, resultó más influyente los años fumando en conjunto con el número de cigarrillos fumados con una diferencia en la PRE del 7% debido a un incremento de la especificidad superior al 18%. De hecho, esta proteína ajustada por el índice paquete-año mostró una PRE incluso ligeramente superior al obtenido con la edad (89% vs 88%). Por lo tanto, la precisión diagnóstica de la anhidrasa carbónica 1 se ve alterada prácticamente en la misma medida por la edad que por el índice paquete-año.

Por el contrario, la GAPDH mostró una disminución de la PRE del 6% considerando los años fumando (92% vs 86%) y superior a un 20% de acuerdo también con el índice paquete-año (71%). Esto podría estar relacionado con su alta precisión diagnóstica sin necesidad de ajustar por ninguna variable clínica, de modo que la introducción del hábito tabáquico añade heterogeneidad al modelo, reduciendo su capacidad para diferenciar entre sujetos sanos y con periodontitis. De hecho, considerando la edad, aunque mejoró el rendimiento, fue la proteína menos beneficiada al incluir esta variable. En consecuencia, la GAPDH subgingival demuestra ser un biomarcador robusto frente a la edad, pero susceptible al efecto del tabaquismo.

Asimismo, las Hbs mostraron un comportamiento dispar de acuerdo con el hábito tabáquico. La Hb beta mostró un aumento de la PRE en torno al 5% al ajustarse por el número de cigarrillos (83% vs 88%), pero una disminución del 11% al considerar sólo los años fumando

(73%), asociada a una reducción de la sensibilidad de un 30% (87,5% vs 57,5%). En contraste, las Hbs alfa y delta incrementaron su PRE al ajustarse por ambas variables tabáquicas, siendo más relevante los años fumando. De hecho, la Hb delta alcanzó la misma PRE-cs que al ajustarse por edad (90,5%), y en la Hb alfa fue incluso superior (90,5% vs 93%). Estos resultados destacan las diferencias del impacto del tabaco sobre la precisión diagnóstica de estos biomarcadores.

La diversidad en los resultados obtenidos de acuerdo con la variable tabáquica puede deberse, en parte, a la dificultad inherente a medir con precisión el hábito tabáquico, ya que la exposición se estimó a partir de información proporcionada por los propios pacientes, susceptible a sesgos de recuerdo y errores de estimación (65). Además, el tabaco ejerce efectos complejos sobre la cascada inflamatoria, exacerbando la respuesta inmunitaria patológica, pero también atenuando la función defensiva normal del sistema inmune (15,65). De hecho, este impacto ha demostrado persistir incluso tras dejar de fumar (16), hallándose también diferencias proteómicas en la expresión de proteínas subgingivales entre exfumadores y sujetos que nunca han fumado (19).

En conjunto, estos hallazgos sugieren que la edad ejerce un impacto más uniforme y predecible sobre la capacidad de las proteínas subgingivales para discriminar entre la salud y la periodontitis, mejorando de forma consistente la precisión diagnóstica de los modelos. Este patrón coincide con observaciones previas en proteínas salivales, donde la edad se ha revelado como un factor más determinante que el tabaco (26), mientras que, en este estudio, en el entorno subgingival el impacto del hábito tabáquico es más complejo y específico de cada biomarcador.

4.3. Relevancia clínica y perspectivas futuras

A pesar de que los parámetros clínicos siguen siendo el método de referencia en el diagnóstico de la periodontitis, se ha destacado la potencial utilidad de los biomarcadores para superar sus limitaciones especialmente relacionadas con la dificultad para detectar estadios tempranos, así como su subjetividad relativa dependiente del profesional (29,66). En este sentido, las técnicas proteómicas resultan especialmente útiles, ya que proteínas identificadas en el FGC mediante estos métodos han demostrado una alta capacidad diagnóstica (25,67-69). Estos resultados refuerzan el valor y la utilidad de la proteómica como herramienta de apoyo al diagnóstico clínico, con potencial para ser trasladado especialmente a entornos especializados (70).

Además, previamente se ha señalado la necesidad de combinar varios biomarcadores para incrementar la precisión diagnóstica, debido a la compleja etiopatogénesis de la enfermedad (71), alcanzándose valores excepcionales al asociar dos proteínas subgingivales (25). No obstante, en este estudio hallamos que proteínas individuales ajustadas por la edad alcanzan resultados similares, siendo más viable su traslado a la práctica clínica.

Sin embargo, en este estudio incluimos sujetos con condiciones clínicas marcadamente divergentes, salud periodontal y periodontitis avanzada (estadios III-IV). Este enfoque maximiza la diferenciación de las proteínas, lo cual está justificado en fases iniciales del descubrimiento de biomarcadores. Con el objetivo de incrementar la aplicabilidad clínica, futuros estudios deberán incluir condiciones periodontales más heterogéneas como periodontitis en estadios iniciales I-II e incluso gingivitis. Esto permitirá determinar si el impacto de las variables clínicas como edad y hábito tabáquico se mantiene o varía dependiendo de la condición periodontal.

Idealmente, la inclusión de un espectro clínico más amplio deberá ir acompañada de un incremento del tamaño muestral. Si bien la muestra analizada es superior a la mayoría de los estudios proteómicos previos (68,69,72-74), no fue suficiente para desarrollar modelos multivariantes que permitieran considerar la edad y hábito tabáquico simultáneamente en el mismo modelo predictivo sin riesgo de sobreajuste. Una mayor representatividad y heterogeneidad poblacional permitiría mejorar la generalización de los hallazgos y afinar el efecto combinado de estos factores de riesgo.

Por otro lado, aunque SWATH-MS se considera una técnica altamente reproducible y precisa (21), estos resultados deben ser validados. Tradicionalmente, se ha recurrido a métodos como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (en inglés “enzyme-linked immunosorbent assay”, ELISA), “Western blot” o matrices de proteínas (en inglés “protein arrays”) (75-77), ya que ofrecen mayor especificidad frente a proteínas individuales (78). No obstante, estas técnicas también presentan limitaciones importantes como la dependencia de anticuerpos altamente específicos y una menor sensibilidad para detectar algunas proteínas (79,80). En consecuencia, la tendencia actual se orienta hacia métodos alternativos de validación como el empleo de SWATH-MS en una cohorte independiente de sujetos o considerar la utilización de técnicas de espectrometría de masas dirigidas como “selected reaction monitoring” (SRM) (81).

5. Conclusión

En conclusión, tanto la edad como el hábito tabáquico influyen en la precisión diagnóstica de las proteínas subgingivales para detectar la periodontitis. No obstante, el impacto de la edad resulta más consistente y sistemático, mejorando el rendimiento de todas las proteínas evaluadas (GAPDH, queratina, tipo II citoesquelética 6A, ZG16B, inhibidor de la proteasa plasmática C1, anhidrasa carbónica 1 y las Hbs alfa, beta y delta), permitiendo alcanzar valores predictivos excepcionales. En contraste, el efecto del hábito tabáquico es más heterogéneo y dependiente del biomarcador, con una precisión diagnóstica que osciló entre valores justos y excelentes, pero afectando negativamente a proteínas como la GAPDH. Estos hallazgos subrayan la importancia de considerar estas variables clínicas al evaluar biomarcadores subgingivales para el diagnóstico de la periodontitis. No obstante, estos resultados deben ser validados en futuras investigaciones.

Referencias bibliográficas

1. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17038. Doi: 10.1038/nrdp.2017.38
2. Gasner NS, Schure RS. Periodontal disease. En: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2025
3. Tsuchida S. Proteome analysis of molecular events in oral pathogenesis and virus: A review with a particular focus on periodontitis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15):5184. Doi: 10.3390/ijms21155184
4. Hajishengallis G. Interconnection of periodontal disease and comorbidities: Evidence, mechanisms, and implications. *Periodontol 2000*. 2022;89(1):9-18. Doi: 10.1111/prd.12430
5. 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;43(5):390-400. Doi: 10.1111/jcpe.12534
6. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci*. 2019;11(3):30. Doi: 10.1038/s41368-019-0064-z
7. Chapple ILC, Mealey BL, Van 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 Periodontol*. 2018;45(S20). Doi: 10.1002/JPER.17-0719
8. Trindade D, Carvalho R, Machado V, Chambrone L, Mendes JJ, Botelho J. Prevalence of periodontitis in dentate people between 2011 and 2020: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *J Clin Periodontol*. 2023;50(5):604-626. Doi: 10.1111/jcpe.13769
9. Bravo-Pérez M, Almerich-Silla JM, Canorea-Díaz E, Casals-Peidro E, Cortés-Martínicorena FJ, Expósito-Delgado A, et al. Encuesta de salud oral en España 2020. *RCOEC*. 2020;25(4):7-35

10. Van Dyke TE, Sheilesh D. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol*. 2005;7(1):3-7.
11. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2013;62(1):59-94. Doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x
12. Kwon T, Lamster IB, Levin L. Current concepts in the management of periodontitis. *Int Dent J*. 2021;71(6):462-476. Doi: 10.1111/idj.12630
13. Alwithanani N. Periodontal disease and smoking: Systematic review. *J Pharm Bioallied Sci*. 2023;15(Suppl 1):S64-S71. Doi: 10.4103/jpbs.jpbs_516_22
14. Camelo-Castillo AJ, Mira A, Pico A, Nibali L, Henderson B, Donos N, et al. Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. *Front Microbiol*. 2015;6:119. Doi: 10.3389/fmicb.2015.00119
15. Qiu F, Liang C, Liu H, Zeng Y, Hou S, Huang S, et al. Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down? *Oncotarget*. 2017;8(1):268-284. Doi: 10.18632/oncotarget.13613
16. Saint-André V, Charbit B, Biton A, Rouilly V, Possémé C, Bertrand A, et al. Smoking changes adaptive immunity with persistent effects. *Nature*. 2024;626(8000):827-835. Doi: 10.1038/s41586-023-06968-8
17. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global prevalence of periodontal disease and lack of its surveillance. *ScientificWorldJournal*. 2020;2020:2146160. Doi: 10.1155/2020/2146160
18. Zhang X, Xiao X, Mu Y, Liu YR, Lin X, Li Q, et al. A comparative proteomic analysis to define the influencing factors on gingival crevicular fluid using LC-MS/MS. *J Proteomics*. 2022;252:104421. Doi: 10.1016/j.jprot.2021.104421
19. Blanco-Pintos T, Regueira-Iglesias A, Kuz I, Sánchez-Barco A, Seijas-Otero N, Chantada-Vázquez MP, et al. Impact of smoking habit on the subgingival proteome in patients with periodontitis. *J Periodontol*. 2025;96(3):217-229. Doi: 10.1002/JPER.24-0062

20. Anjo SI, Santa C, Manadas B. SWATH-MS as a tool for biomarker discovery: From basic research to clinical applications. *Proteomics*. 2017;17(3-4). Doi: 10.1002/pmic.201600278
21. 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;14(8):e8126. Doi: 10.15252/msb.20178126
22. Chantada-Vázquez MP, García Vence M, Serna A, Núñez C, Bravo SB. SWATH-MS protocols in human diseases. En: Carrera M, Mateos J, editores. *Shotgun proteomics. Methods Mol Biol*. Clifton, NJ; 2021. p. 105-141. Doi: 10.1007/978-1-0716-1178-4_7
23. Smith RD. Mass spectrometry in biomarker applications: from untargeted discovery to targeted verification, and implications for platform convergence and clinical application. *Clin Chem*. 2012;58(3):528-530. Doi: 10.1373/clinchem.2011.180596
24. Blanco-Pintos T, Regueira-Iglesias A, Suárez-Rodríguez B, Seijas-Otero N, Relvas M, Bravo SB, et al. Characterisation of the periodontal proteome in gingival crevicular fluid and saliva using SWATH-MS. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025;15:1576906. Doi: 10.3389/fcimb.2025.1576906
25. Blanco-Pintos T, Regueira-Iglesias A, Relvas M, Alonso-Sampedro M, Chantada-Vázquez MP, Balsa-Castro C, et al. Using SWATH-MS to identify new molecular biomarkers in gingival crevicular fluid for detecting periodontitis and its response to treatment. *J Clin Periodontol*. 2024;51(10):1342-1358. Doi: 10.1111/jcpe.14037
26. Blanco-Pintos T, Regueira-Iglesias A, Relvas M, Alonso-Sampedro M, Bravo SB, Balsa-Castro C, et al. Diagnostic accuracy of novel protein biomarkers in saliva to detect periodontitis using untargeted 'SWATH' mass spectrometry. *J Clin Periodontol*. 2025;52(2):199-214. Doi: 10.1111/jcpe.14103
27. Mulla SA, Patil A, Mali S, Jain A, Sharma D, Jaiswal HC, et al. Exploring the biological width in dentistry: A comprehensive narrative review. *Cureus*. 2023;15(7):e42080. Doi: 10.7759/cureus.42080
28. 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;45(S20). Doi: 10.1111/jcpe.12935
29. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018;89(S1). Doi: 10.1002/JPER.18-0006
30. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191-2194. Doi: 10.1001/jama.2013.281053
31. UniProt Consortium. Activities at the universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*. 2014;42(D1):D191-D198. Doi: 10.1093/nar/gkt1140
32. Aggarwal S, Yadav AK. False discovery rate estimation in proteomics. *Methods Mol Biol*. 2016;1362:119-128. Doi: 10.1007/978-1-4939-3106-4_7
33. 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;15(7):1202-1214. Doi: 10.1002/pmic.201400353
34. Hajian-Tilaki K. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics. *J Biomed Inform*. 2014;48:193-204. Doi: 10.1016/j.jbi.2014.02.013
35. Bhatt SP, Kim Y, Harrington KF, Hokanson JE, Lutz SM, Cho MH, et al. Smoking duration alone provides stronger risk estimates of chronic obstructive pulmonary disease than pack-years. *Thorax*. 2018;73(5):414-421. Doi: 10.1136/thoraxjnl-2017-210722
36. Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: Findings from NHANES III. *J Periodontol*. 2000;71(5):743-751. Doi: 10.1902/jop.2000.71.5.743
37. 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/>
38. Moons KGM, Altman DG, Reitsma JB, Ioannidis JPA, Macaskill P, Steyerberg EW, et al. Transparent Reporting of a multivariable prediction model for Individual Prognosis Or

- Diagnosis (TRIPOD): Explanation and elaboration. *Ann Intern Med.* 2015;162(1):W1-73. Doi: 10.7326/M14-0698
39. Hastie T. gam: Generalized additive models. R package version 1.22. 2022. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=gam>
40. Rigby RA, Stasinopoulos MD, Heller GZ, De Bastiani F. Distributions for modeling location, scale, and shape: Using GAMLSS in R. CRC Press; 2021. Doi: 10.1201/9780429298547
41. Stasinopoulos MD, Rigby RA, Heller GZ, Voudouris V, Bastiani FD. Flexible regression and smoothing: Using GAMLSS in R. CRC Press; 2017. Doi: 10.1201/b21973
42. Prabhakaran S. InformationValue: Performance analysis and companion functions for binary classification models. R. package version 1.2.3. 2016. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=InformationValue>
43. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J, Müller M. pROC: An open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:77. Doi: 10.1186/1471-2105-12-77
44. Carstensen B, Plummer M, Laara E, Hills M. Epi: A package for statistical analysis in epidemiology. R package version 2.47. 2023. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=Epi>
45. Hosmer DW, Lemeshow S, Sturdivant RX. Applied logistic regression. 3rd ed. New York (USA): John Wiley and Sons; 2013. Doi: 10.1002/9781118548387
46. De Luca Canto G, Pachêco-Pereira C, Aydinoz S, Major PW, Flores-Mir C, Gozal D. Diagnostic capability of biological markers in assessment of obstructive sleep apnea: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Sleep Med.* 2015;11(1):27-36. Doi: 10.5664/jcsm.4358
47. Tisdale EJ. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase ciota/lambda and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway. *J Biol Chem.* 2002;277(5):3334-3341. Doi: 10.1074/jbc.M109744200

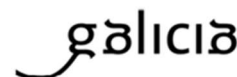
48. Arif A, Chatterjee P, Moodt RA, Fox PL. Heterotrimeric GAIT complex drives transcript-selective translation inhibition in murine macrophages. *Mol Cell Biol.* 2012;32(24):5046-5055. Doi: 10.1128/MCB.01168-12
49. Gao X, Wang X, Pham TH, Feuerbacher LA, Lubos M, Huang M, et al. NleB, a bacterial effector with glycosyltransferase activity, targets GAPDH function to inhibit NF- κ B activation. *Cell Host Microbe.* 2013;13(1):87-99. Doi: 10.1016/j.chom.2012.11.010
50. Wojcik SM, Bundman DS, Roop DR. Delayed wound healing in keratin 6a knockout mice. *Mol Cell Biol.* 2000;20(14):5248-5255. Doi: 10.1128/MCB.20.14.5248-5255.2000
51. Groeger S, Meyle J. Oral mucosal epithelial cells. *Front Immunol.* 2019;10:208. Doi: 10.3389/fimmu.2019.00208
52. Youn SE, Jiang F, Won HY, Hong DE, Kang TH, Park Y, et al. PAUF induces migration of human pancreatic cancer cells exclusively via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway. *Int J Mol Sci.* 2022;23(19):11414. Doi: 10.3390/ijms231911414
53. Ghosh S, Ahearn CP, Isabella CR, Marando VM, Dodge GJ, Bartlett H, et al. Human oral lectin ZG16B acts as a cell wall polysaccharide probe to decode host–microbe interactions with oral commensals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023;120(22):e2216304120. Doi: 10.1073/pnas.2216304120
54. Aulak KS, Davis AE, Donaldson VH, Harrison RA. Chymotrypsin inhibitory activity of normal C1-inhibitor and a P1 Arg to his mutant: Evidence for the presence of overlapping reactive centers. *Protein Sci.* 1993;2(5):727-732. Doi: 10.1002/pro.5560020504
55. Beinrohr L, Murray-Rust TA, Dyksterhuis L, Závodszky P, Gál P, Pike RN, et al. Serpins and the complement system. *Methods Enzymol.* 2011;499:55-75. Doi: 10.1016/B978-0-12-386471-0.00004-3
56. Occhipinti R, Boron WF. Role of carbonic anhydrases and inhibitors in acid–base physiology: Insights from mathematical modeling. *Int J Mol Sci.* 2019;20(15):3841. Doi: 10.3390/ijms20153841

57. Vitkov L, Minnich B, Knopf J, Schauer C, Hannig M, Herrmann M. NETs are double-edged swords with the potential to aggravate or resolve periodontal inflammation. *Cells*. 2020;9(12):2614. Doi: 10.3390/cells9122614
58. Gell DA. Structure and function of haemoglobins. *Blood Cells Mol Dis*. 2018;70:13-42. Doi: 10.1016/j.bcmed.2017.10.006
59. 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;11(1):31-41. Doi: 10.1586/14789450.2014.864953
60. Smalley JW, Olczak T. Heme acquisition mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* – strategies used in a polymicrobial community in a heme-limited host environment. *Mol Oral Microbiol*. 2017;32(1):1-23. Doi: 10.1111/omi.12149
61. Sampath P, Mazumder B, Seshadri V, Fox PL. Transcript-selective translational silencing by gamma interferon is directed by a novel structural element in the ceruloplasmin mRNA 3' untranslated region. *Mol Cell Biol*. 2003;23(5):1509-1519. Doi: 10.1128/MCB.23.5.1509-1519.2003
62. Ebersole JL, Graves CL, Gonzalez OA, Dawson D 3rd, Morford LA, Huja PE, et al. Aging, inflammation, immunity and periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2016;72(1):54-75. Doi: 10.1111/prd.12135
63. Uçan Yarkaç F, Babayiğit O, Gokturk O. Associations between immune-inflammatory markers, age, and periodontal status: a cross-sectional study. *Odontology*. 2024;112(4):1296-1306. Doi: 10.1007/s10266-024-00907-3
64. Zhang X, Xiao X, Mu Y, Liu YR, Lin X, Li Q, et al. A comparative proteomic analysis to define the influencing factors on gingival crevicular fluid using LC-MS/MS. *J Proteomics*. 2022;252: 104421. Doi: 10.1016/j.jprot.2021.104421
65. Lahdentausta L, Paju S, Mäntylä P, Buhlin K, Pietiäinen M, Tervahartiala T, et al. Smoking confounds the periodontal diagnostics using saliva biomarkers. *J Periodontol*. 2019;90(5):475-483. Doi: 10.1002/JPER.18-0545

66. Preianò M, Savino R, Vilella C, Pelaia C, Terracciano R. Gingival crevicular fluid peptidome profiling in healthy and in periodontal diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):5270. Doi: 10.3390/ijms21155270
67. 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;40(2):131-139. Doi: 10.1111/jcpe.12037
68. Tang H, Yuan C, Ma Z, Zhu C, Tong P, Gallagher JE, et al. The potentiality of salivary peptide biomarkers for screening patients with periodontal diseases by mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 2019;495:278-286. Doi: 10.1016/j.cca.2019.04.076
69. 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;225:121956. Doi: 10.1016/j.talanta.2020.121956
70. Mundt F, Albrechtsen NJW, Mann SP, Treit P, Ghodgaonkar-Steger M, O'Flaherty M, et al. Foresight in clinical proteomics: current status, ethical considerations, and future perspectives. *Open Res Eur.* 2023;3:59. Doi: 10.12688/openreseurope.15810.1
71. Blanco-Pintos T, Regueira-Iglesias A, Seijo-Porto I, Balsa-Castro C, Castelo-Baz P, Nibali L, et al. Accuracy of periodontitis diagnosis obtained using multiple molecular biomarkers in oral fluids: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2023;50(11):1420-1443. Doi: 10.1111/jcpe.13854
72. 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.* 2022;15(6):2161. Doi: 10.3390/ma15062161
73. 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;49(7):622-632. Doi: 10.1111/jcpe.13630

74. Torres A, Michea MA, Végvári Á, Arce ME, Morales A, Lanyon E, et al. Proteomic profile of human gingival crevicular fluid reveals specific biological and molecular processes during clinical progression of periodontitis. *J Periodontal Res.* 2025;58(5):1061-1081. Doi: 10.1111/jre.13169
75. 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/MSE (gingival exudatome). *J Proteome Res.* 2010;9(5):2191-2199. Doi: 10.1021/pr900941z
76. 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.* 2020;23(2):123. Doi: 10.3892/mmr.2020.11762
77. Shin M, Kim Y, Shin YJ, Ko BJ, Kim S, Kim H. Deep sequencing salivary proteins for periodontitis using proteomics. *Clin Oral Investig.* 2018;23(9):3571-3580. Doi: 10.1007/s00784-018-2779-1
78. Alharbi RA. Proteomics approach and techniques in identification of reliable biomarkers for diseases. *Saudi J Biol Sci.* 2020;27(3):968-974. Doi: 10.1016/j.sjbs.2020.01.020
79. Buhimschi IA, Buhimschi CS, Weiner CP, Kimura T, Hamar BD, Sfakianaki AK, et al. Proteomic but not enzyme-linked immunosorbent assay technology detects amniotic fluid monomeric aalgranulins from their complexed calprotectin form. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(7):837-844. Doi: 10.1128/CDLI.12.7.837-844.2005
80. Jayasena T, Poljak A, Braidy N, Zhong L, Rowlands B, Muenchhoff J, et al. Application of targeted mass spectrometry for the quantification of sirtuins in the central nervous system. *Sci Rep.* 2016;6:35391. Doi: 10.1038/srep35391
81. Rahman SMJ, Chen S, Wang Y, Gao Y, Schepmoes AA, Fillmore TL, et al. Validation of a proteomic signature of lung cancer risk from bronchial specimens of risk-stratified individuals. *Cancers.* 2023;15(18):4504. Doi: 10.3390/cancers15184504

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/cve7dcve=SAOC-F4G4-BOAH-OF40-TWFB-N4DG-1GTH-R163-8275-7817-62>



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,

