

**Tesis Doctoral**

IDENTIFICACIÓN  
DE GENES ESPECÍFICOS DE  
ENFERMEDAD PERIODONTAL  
MEDIANTE MICROARRAY



ANTONIO ROA LÓPEZ

IDENTIFICACIÓN  
DE GENES ESPECÍFICOS DE  
ENFERMEDAD PERIODONTAL  
MEDIANTE MICROARRAY



TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTOS DE ESTOMATOLOGÍA E HISTOLOGÍA

ANTONIO ROA LÓPEZ

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Antonio Roa López  
D.L.: GR 2313-2009  
ISBN: 978-84-692-3122-7



# IDENTIFICACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS DE ENFERMEDAD PERIODONTAL MEDIANTE MICROARRAY

Memoria que presenta el doctorando  
Antonio Roa López  
para aspirar al título de Doctor por la Universidad de Granada.

Fdo.: Antonio Roa López

VºBº El Director de Tesis

VºBº El Director de Tesis

Fdo.: Gerardo Moreu Burgos  
Profesor titular  
Universidad de Granada

Fdo.: Miguel Alaminos Mingorance  
Profesor titular  
Universidad de Granada

VºBº El Director de Tesis

Fdo.: Maximino González-Jaranay Ruiz  
Profesor titular  
Universidad de Granada

Departamentos de Estomatología e Histología  
Universidad de Granada  
2009



## *Agradecimientos:*

«*De bien nacidos es ser agradecidos*», y yo he adquirido unas deudas personales tan grandes que me temo que me va a llevar toda una vida poder saldarlas, y ni mucho menos las van a poder finiquitar una página escrita. Pero por algún lugar habrá que empezar:

- A mis directores de Tesis, Prof. Gerardo Moreu Burgos, Prof. Miguel Alaminos Mingorance y Prof. Maximino González-Jaranay Ruiz, por la fe depositada en mi persona, pues sin su reiterado empeño no me habría animado a realizar el Doctorado, sin su ayuda me habría sido imposible llevar a buen puerto su finalización, y sin su dedicación hasta en horas intempestivas no habría permitido finalizarla en el plazo de tiempo en el que se ha producido.
- A mis amigos Gerardo Moreu, Miguel Alaminos y Maximino González-Jaranay, pues fuera del ámbito académico me han prestado algo más importante que dirigir la presente Tesis Doctoral: su amistad.
- A los profesores y becarios del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, en especial al Prof. Antonio Campos Muñoz, Profa. M<sup>a</sup> del Carmen Sánchez Quevedo y a Dña. Ingrid Garzón Bello, pues su entusiasmo e intensa dedicación a la labor investigadora y sus amplísimos conocimientos han permitido la elaboración y finalización de esta Tesis Doctoral.
- Al Prof. Juan Gijón Martín, por hacerme ver de vez en cuando el lado «más desenfadado» de la odontología.
- A mis amigos y compañeros de fatigas del Máster de Periodoncia, Dr. Javier Fernández Delgado, Dr. Luis Téllez Bermejo, Dra. Irina Sacchi Orloff, (e inminentes doctores) Juan José Fernández-de Rota Conde y Jerónimo Rubio Roldán, por el apoyo que me han dado y por los buenos momentos que hemos pasado...y lo que nos queda.
- A mis padres Francisco y Mariángeles, y a mi hermano Rafa, por lo que me tienen que aguantar.

- A mis compañeros y amigos, en especial a Gustavo González Ruiz y Pablo Rodas Ibáñez, ya que soportar a este raro cabezota y que me sigan considerando como amigo tiene su mérito.
- A los pacientes, ya que sin su desinteresada colaboración no habría sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.



*A mi familia.*



« *La luz al final del túnel  
puede ser la del tren  
que viene de frente* »

Anónimo.





# INDICE

	pág.
1.INTRODUCCIÓN -----	17
1.1. LAS ESTRUCTURAS DE SOPORTE DEL DIENTE: PERIODONTO DE INSERCIÓN Y PERIODONTO DE PROTECCIÓN -----	19
Periodonto de inserción -----	19
Periodonto de protección -----	21
1.2. LA ENFERMEDAD PERIODONTAL -----	25
Epidemiología -----	25
Etiopatogenia -----	26
Histopatología -----	33
Clasificación de las enfermedades periodontales -----	35
Criterios diagnósticos de la enfermedad periodontal -----	35
2.OBJETIVOS -----	39
3.MATERIAL Y MÉTODOS -----	43
Material -----	45
Método -----	45
4.RESULTADOS -----	53
Determinación de perfiles de expresión en cada grupo -----	55
Análisis comparativo -----	60
Algoritmo clasificatorio -----	60
5.DISCUSIÓN -----	87
6.CONCLUSIONES -----	105
7.BIBLIOGRAFÍA -----	109





# INDICE DE TABLAS

	pág.
1. <i>Clasificación de las enfermedades periodontales.</i> -----	36
2. <i>Características de las muestras de mucosa oral sana.</i> -----	46
3. <i>Características de las muestras de mucosa oral con alteración periodontal.</i> -----	47
4. <i>Genes/EST sobreexpresados en los grupos control y periodontal.</i> -----	61
5. <i>Funciones génicas agrupadas de los genes expresados más de 5.000 u.f. en los grupos control y periodontal.</i> -----	73
6. <i>Análisis comparado de los genes/EST expresados significativamente diferente en los grupos control y periodontal.</i> -----	76
7. <i>Genes/EST del algoritmo clasificadorio.</i> -----	80







# INDICE DE FIGURAS

	pág.
1. Estructuras periodontales. -----	19
2. Micrografía del ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. (Tomado de Beertsen et al., 2005) -----	20
3. Periodonto de protección. -----	21
4. Imagen histológica de la encía. (Modificado de Schroeder et al., 1997) -----	22
5. Esquema de la etiopatogenia de la enfermedad periodontal. -----	27
6. Lesión inicial. -----	33
7. Lesión establecida. -----	34
8. Lesión avanzada. -----	34
9. Modelo de consentimiento informado utilizado. -----	48
10. Modelo de consentimiento informado utilizado. -----	49
11. Gráfico de las funciones de los genes/EST sobreexpresados en las muestras sanas. -----	56
12. Gráfico de las funciones de los genes/EST sobreexpresados en las muestras con alteración periodontal. -----	58
13. Representación de las funciones génicas en el grupo control por el programa BiNGO. -----	82
14. Representación de las funciones génicas en el grupo periodontal por el programa BiNGO. -----	83
15. Algoritmo clasificadorio. -----	84
16. Clasificación de una muestra test utilizando el algoritmo clasificadorio. ----	85
17. Gráfico comparativo entre los genes/EST sobreexpresados en más de 5.000 u.f. y los resultados del artículo de Demmer et al. -----	98
18. Gráfico comparativo entre los genes/EST sobreexpresados exclusivamente en una u otra muestra y los resultados del artículo de Demmer et al. -----	98





# INTRODUCCIÓN



## 1.1 LAS ESTRUCTURAS DE SOPORTE DEL DIENTE: PERIODONTO DE INSERCIÓN Y PERIODONTO DE PROTECCIÓN.

El conjunto de tejidos que rodean, soportan, y dan protección a los dientes se denomina periodonto. De acuerdo con su función, el periodonto se divide en (Gómez de Ferraris y Campos, 2004):

funcional. Su función es la de alojar y soportar al diente, así como amortiguar las fuerzas de la masticación (Gómez de Ferraris y Campos, 2004; Lindhe *et al.*, 2008). (Fig. 1)

### 1. Periodonto de inserción

del que forman parte el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar, los cuales comparten un mismo origen embriológico y constituyen entre sí una unidad

- **Ligamento periodontal.** Es una fina capa de tejido conectivo fibroso situada entre el diente y el hueso alveolar. Las fibras, elemento principal que constituye el ligamento periodontal y de las cuales se

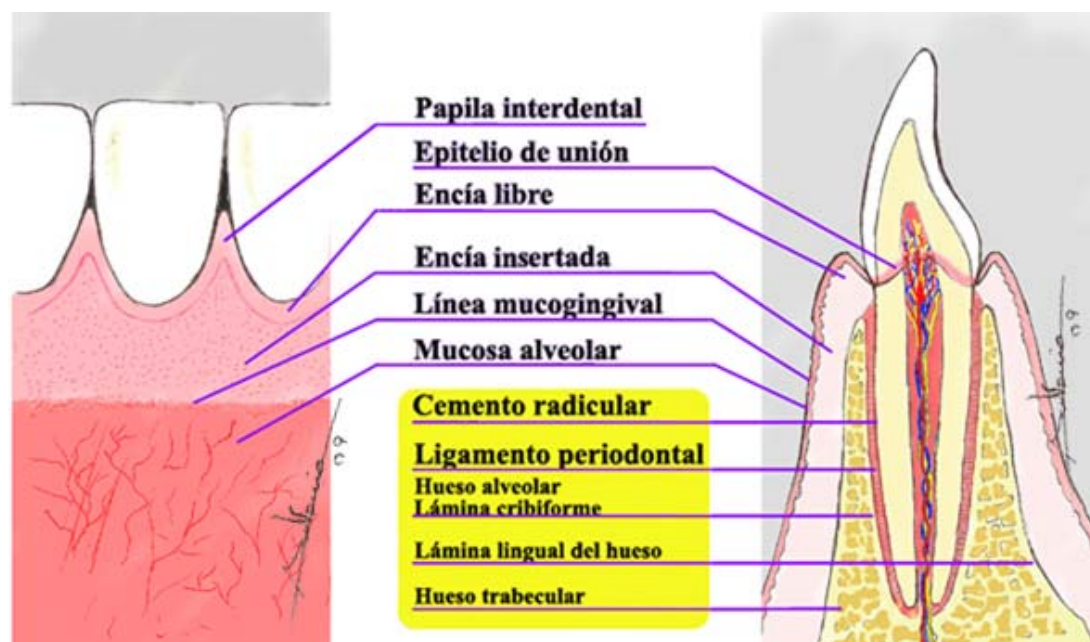


Fig. 1: Estructuras periodontales. Sobre fondo amarillo, estructuras que forman el periodonto de inserción.

- Gómez de Ferraris ME, Campos A. Histología y embriología bucodental. 2ª Edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2004.
- Lindhe J, Karring T, Araujo M. The anatomy of periodontal tissues. En: Lindhe J, Lang NP, Karring T. Clinical periodontology and implant dentistry. Volume 1. 5ª edición. Oxford: Blackwell Publishing LTD 2008; 3-49.

distinguen distintos tipos (colágenas, reticulares, elásticas, oxitalánicas y de elaunina), se insertan por una parte en el cemento del diente y por otra en el hueso alveolar, formando una malla que une firmemente el diente al hueso que lo aloja, proporcionándole soporte, protección, y una capacidad sensitiva propioceptiva necesaria para la oclusión y para una correcta función masticatoria. En la región del ápice dentario, el ligamento periodontal se relaciona con el tejido conectivo pulpar, mientras que en la parte cervical del diente se relaciona con el corion gingival, formando con ambos un conjunto estructural y funcional (Beertsen *et al.*, 1997; Gómez de Ferraris y Campos, 2004; Nanci y Bosshardt, 2006) (Fig. 2).

- **Cemento.** El cemento es un tejido conectivo mineralizado, duro, avascular, derivado del ectomesénquima, compuesto por una matriz orgánica (principalmente constituida por cementocitos y cementoblastos) e inorgánica (fundamentalmente hidroxapatita), que cubre la superficie de los dientes en su porción radicular y que sirve de unión a las fibras del ligamento periodontal. Se distinguen

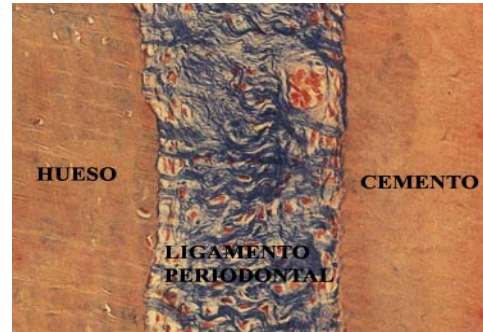


Fig. 2: Micrografía del ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. Tomada de Beertsen *et al.*, 2005.

dos tipos de cemento: cemento celular, que se encuentra en el tercio apical y en zonas de bifurcación, y que está formado principalmente por haces de fibras intrínsecas; y cemento acelular, que comprende de la mitad cervical a los dos tercios radiculares y que está compuesto principalmente por fibras extrínsecas altamente mineralizadas (Bosshardt y Selvig, 1997; Gómez de Ferraris y Campos, 2004; Nanci y Bosshardt, 2006) (Fig. 2).

- **Hueso alveolar.** Forman parte del hueso maxilar y mandibular, no existiendo una delimitación clara entre éstos y el proceso alveolar propiamente dicho. El hueso alveolar se compone de un hueso cortical en su parte periférica y un hueso medular en su parte central, variando su

- Beertsen WB, McCulloch CAG, Sode J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000* 1997; 13: 20-40.
- Gómez de Ferraris ME, Campos A. *Histología y embriología bucodental*. 2ª Edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2004.
- Nanci A, Bosshardt D. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000* 2006; 40: 11-28.
- Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000* 1997; 13: 41-75.

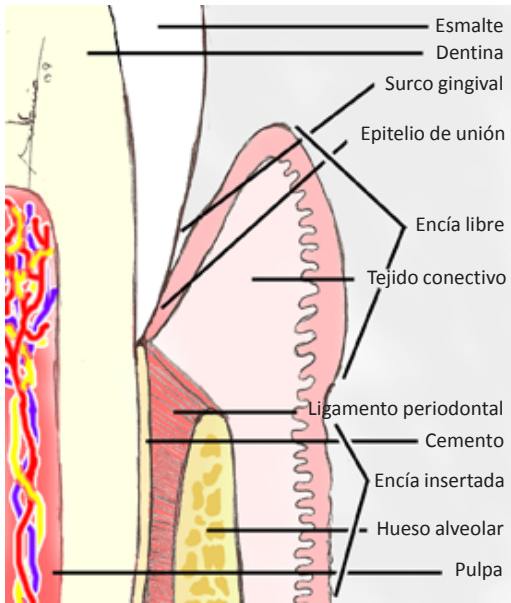


Fig. 3: Periodonto de protección.

contenido dependiendo de la región oral donde se encuentre. Su función es la de servir de alojamiento de los dientes y, en el caso de la pérdida de éstos, se atrofia y termina desapareciendo (Gómez de Ferraris y Campos, 2004; Nanci y Bosshardt, 2006; Saffar *et al.*, 1997). (Fig. 2)

## 2. Periodonto de protección

El periodonto de protección es el encargado de aislar y proteger del medio exterior a las estructuras de sostén de los dientes, así como de su nutrición. Comprende dos regiones: la unión dentogingival, que une la

encia al diente; y la encía, que rodea la parte cervical del diente (Gómez de Ferraris y Campos, 2004; Nanci y Bosshardt, 2006; Schroeder y Listgarten, 1997). (Fig. 3)

- **Unión dentogingival.** Su función es la de unir la encía al diente. Se distinguen tres partes distintas: el epitelio del surco, epitelio de unión y corion subyacente a éstos. (Fig. 3)

El epitelio del surco es un epitelio plano, estratificado no queratinizado que se sitúa entre el epitelio de la encía libre y el epitelio de unión, sin que exista una diferenciación clara entre ellos. El epitelio del surco delimita una de las vertientes del surco gingival (espacio que se forma entre la superficie dental y la encía), desde el borde libre de la encía hasta el epitelio de unión (Fig. 3). Histológicamente se asemeja al epitelio de unión con la salvedad de que en el epitelio del surco las células están más próximas entre sí y los espacios intercelulares no son tan amplios (Gómez de Ferraris y Campos, 2004).

El epitelio de unión es un epitelio plano estratificado no queratinizado

- Gómez de Ferraris ME, Campos A. Histología y embriología bucodental. 2ª Edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2004.
- Nanci A, Bosshardt D. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000 2006; 40: 11-28.
- Saffar JL, Lasfargues JJ, Cherruau M. Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable. *Periodontol* 2000 1997; 13: 76-90.
- Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol* 2000 1997; 13: 91-120.

que une la encía al diente mediante dos láminas basales (una interna con el diente y otra externa que lo une al tejido conectivo subyacente), formando un rodete alrededor de éste y conformando el suelo del surco gingival (Gómez de Ferraris y Campos, 2004).

- **Encía.** La encía es la parte de la mucosa oral masticatoria que tapiza los procesos o rebordes alveolares y rodea el cuello del diente por su vertiente bucal.

En estado de ausencia de enfermedad e inflamación, la encía se muestra con una tonalidad más o menos rosácea, dependiendo de la vascularización que tenga; y la superficie presenta un aspecto denominado «de piel de naranja», con una consistencia firme y resiliente. Sin embargo, si se está ante una patología que afecta a la encía como la gingivitis, ésta aparece edematosa, inflamada y sangrante al mínimo contacto e incluso de forma espontánea (Wolf *et al.*, 2005).

La encía se puede dividir en dos tipos (Gómez de Ferraris y Campos, 2004):

Encía libre, no unida al hueso subyacente y que discurre desde el

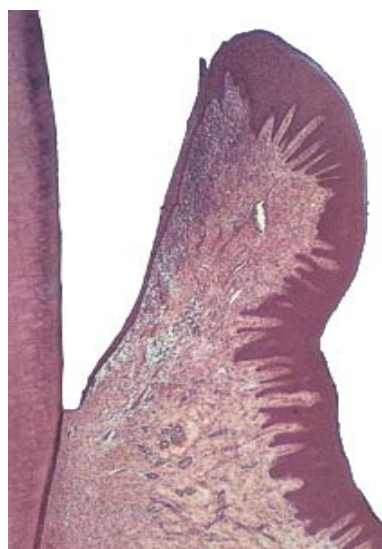


Fig. 4: Imagen histológica de la encía. Modificada de Schroeder *et al.*, 2004.

borde gingival libre hasta la línea mucogingival

Encía insertada, que discurre desde la línea mucogingival como continuación de la encía libre y que está unida al hueso alveolar y al cemento.

Al igual que toda mucosa oral, la encía se compone de dos capas conectadas por una membrana basal: una capa externa, epitelial, y otra interna de tejido conectivo. La unión entre las dos no es lineal, sino que se observan unas invaginaciones y evaginaciones de aspecto digital que facilitan la nutrición del epitelio. (Fig. 4)

- Gómez de Ferraris ME, Campos A. Histología y embriología bucodental. 2ª Edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2004.

- Wolf HF, Rateitschak-Pluss EM, Rateitschak KH, Hassell TM. Color atlas of dental medicine: periodontology. 3rd edition. New York: Thieme; 2005.



**I- Tejido epitelial de la mucosa oral.** Se compone de células (agrupadas en dos poblaciones, una intrínseca y otra extrínseca) que constituyen una barrera de protección entre el medio externo y el tejido conectivo.

**a) Población intrínseca,** compuesta principalmente por queratinocitos dispuestos en cuatro capas: basal, espinosa, granulosa y córnea que se diferencian, entre otras características, por el grado de maduración de los queratinocitos que lo componen, morfología de éstos y cantidad de filamentos presentes.

En relación a la morfología de los queratinocitos, su superficie muestra unas estructuras que favorecen el flujo de las secreciones y la cohesión intercelular tras desaparecer los desmosomas. Dependiendo de la forma que adopten dichas estructuras, se clasifican en cinco patrones celulares posibles (Moreu *et al.*, 1993):

- *Patrón celular tipo I*, caracterizado por la presencia de microvellosidades. Corresponden con los queratinocitos más indiferenciados, aquellos que conforman las capas basal y espinosa.

- *Patrón celular tipo II*, en la que se observan una crestas superficiales denominadas microplicas rectas.

- *Patrón celular tipo III*, en el que es característica la presencia de microplicas curvas.

- *Patrón celular tipo IV*, o reticular, con microplicas circulares, ramificadas y confluentes.

(Estos tipos II, III y IV, en los que es característica la presencia de microplicas los van exhibiendo los queratinocitos a medida que se van diferenciando.)

- *Patrón celular tipo V*, que presenta un patrón poroso, y que adoptan los queratinocitos al final de su proceso de diferenciación.

**b) Población extrínseca,** formada por células permanentes (melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans), que representan un 9% del total de la población celular del epitelio; y células transitorias (granulocitos, linfocitos y monocitos), que constituyen un 1%.

**II- Membrana basal.** Se compone de una lámina basal sintetizada por las células del epitelio y la cual, a su vez, se divide en una lámina lúcida (que contiene laminina y entactina) y una lámina densa (de colágeno tipo IV y heparán); y una lámina reticular,

---

- Moreu G, Sánchez-Quevedo MC, López-Escámez JA, González-Jaranay M, Campos A. Cell surface patterns in normal human oral gingival epithelium. A quantitative scanning electron microscopy approach. *Histol Histopathol* 1993; 8: 47-50.

sintetizada por las células del conectivo y constituida por fibras colágenas inmersas en una matriz de glucosaminoglucanos. La función de la membrana basal es la de servir de fijación entre epitelio y conectivo, barrera química, física y defensiva, y guía para la migración celular en la reepitelización de heridas (Gómez de Ferraris y Campos, 2004).

**III- Corion de la mucosa oral.**  
Lámina de tejido conectivo laxo, denso, o semidenso (dependiendo de la región en la que se encuentre), de espesor variable, que sustenta y nutre al epitelio. Está compuesto de célula (fibroblastos, linfocitos, macrófagos y células plasmáticas entre otras), fibras (colágenas, elásticas y reticulares) y sustancia fundamental, en relación variable según la zona de la cavidad oral.

---

- Gómez de Ferraris ME, Campos A. Histología y embriología bucodental. 2ª Edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2004.

## 1.2 LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

El término enfermedad periodontal engloba a los procesos patológicos que afectan a los tejidos de soporte de los dientes, desde la inflamación de la encía (gingivitis) hasta su extensión hacia el ligamento periodontal y el hueso adyacente, dando lugar a la aparición de bolsas periodontales, y provocando una pérdida ósea y de inserción progresiva (periodontitis) (AAP, 2001).

La gingivitis es un estado inflamatorio que afecta a la encía y se produce como consecuencia de una acción directa de la respuesta inmune frente a las bacterias que se encuentra en la placa dental, la cual induce los cambios que se van a producir en los tejidos de forma directa e indirecta. A su vez, se puede ver modificada por factores ambientales (tabaco, medicamentos, ...) e inherentes al propio paciente (cambios hormonales,...) (Haffajee & Socransky 1994). Es un estado reversible en el cual tras la eliminación de la causa que lo provoca se produce una restitución «ad integrum»; y que se caracteriza clínicamente por un

enrojecimiento de la encía con sangrado, edema, cambio en la superficie, pérdida de adaptación del tejido a los dientes y aumento del flujo de fluido crevicular (AAP, 1999).

La periodontitis es un proceso inflamatorio irreversible de los tejidos de soporte de los dientes en el que se produce una migración hacia la región apical de los tejidos de inserción del diente y una pérdida paulatina del hueso y del ligamento periodontal, interrumpiéndose su unión al cemento. Es irreversible y se debe a la acción de los microorganismos sobre un hospedador susceptible (o sitios de éste) y modificada por factores ambientales (AAP, 1999).

### 1 Epidemiología

La enfermedad periodontal es uno de los procesos más frecuentes de la cavidad oral. La gingivitis ya aparece en la infancia, su presencia es mayor en personas jóvenes y adolescentes, llegando a indicarse una prevalencia de hasta el 60%, y tiende a

- 
- AAP. American Academy of Periodontology. Glossary of periodontal terms. 4<sup>th</sup> edition. Chicago: American Academy of Periodontology; 2001.
  - Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 78-111.
  - AAP. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol* 1999; 70: 457-470.

estabilizarse en personas con edades más avanzadas (AAP, 2005). Sin embargo, más que el porcentaje de personas en la que está presente la gingivitis, la importancia de ésta estriba en que parte de ellas evolucionarán a una periodontitis.

La periodontitis crónica es la forma más común de periodontitis y, aunque la mayoría de las personas adultas padecen periodontitis leves o moderadas, la prevalencia de periodontitis graves generalizadas en esta cohorte es menor, variando los valores entre un 5% y un 15%, aumentando con el envejecimiento (AAP, 2005). Su distribución no es uniforme entre razas (ligeramente mayor en población negra), etnias, ni nivel socioeconómico (mayor en niveles más bajos) (Albandar y Rams, 2002).

Los datos obtenidos en los estudios de los últimos años, aun siendo escasos debido en parte al cambio de terminología de 1999, sugieren una posible tendencia a la disminución de la prevalencia de periodontitis en parte de Europa y de EE.UU. (Hugoson y Norderyd, 2008).

## 2. Etiopatogenia

La etiología de la enfermedad periodontal no es bien conocida, aunque sí se sabe que es una enfermedad multifactorial en la cual hay, al menos, tres tipos de factores etiológicos fundamentales relacionados con la aparición y la progresión de esta enfermedad. (Fig.5)

**I- Factor microbiológico.** El factor etiológico responsable de la instauración y desarrollo de la enfermedad periodontal es el microbiológico, sobre todo debido a bacterias anaerobias Gram negativas (Haffajee y Socransky 1994).

De entre las más de 400 especies microbianas que se pueden encontrar formando parte de la placa bacteriana subgingival (Kinane, 2001) sólo un pequeño número de éstas (entre 10 y 20 especies) son verdaderos agentes etiológicos, capaces de desencadenar una enfermedad periodontal (Moore y Moore, 1994; Socransky y Haffajee, 1994). Los principales microorganismos

- 
- AAP. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Epidemiology of periodontal diseases. *J Periodontol* 2005; 76: 1406-1419.
  - Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontology* 2000 2002; 29: 7-10.
  - Hugoson A, Norderyd O. Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years? *J Clin Periodontol* 2008; 35: 338-345.
  - Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 78-111.
  - Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 2001; 25: 8-20.
  - Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 66-77.
  - Socransky S, Haffajee A. Evidence of bacterial aetiology: a historical perspective. *Periodontol* 2000 1994; 5: 7-25.

responsables de la enfermedad periodontal son el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, antiguamente conocido como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Nørskov-Lauritsen y Kilian, 2006); *Tannerella forsythensis*, antes denominado *Bacteroides forsythus* (Sakamoto et al., 2002); *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella*

*nigrescens*, *Streptococcus intermedius*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Peptostreptococcus micros* y *Treponema denticola* (Kinane, 2001; Zambon et al., 1996, Socransky y Haffajee, 2008). También es conocido el hecho de que dentro de estas especies sólo unos subtipos genéticos son periodontopatógenos (Haffajee y Socransky, 1994; Zambon et al., 1996), debido a que son capaces de

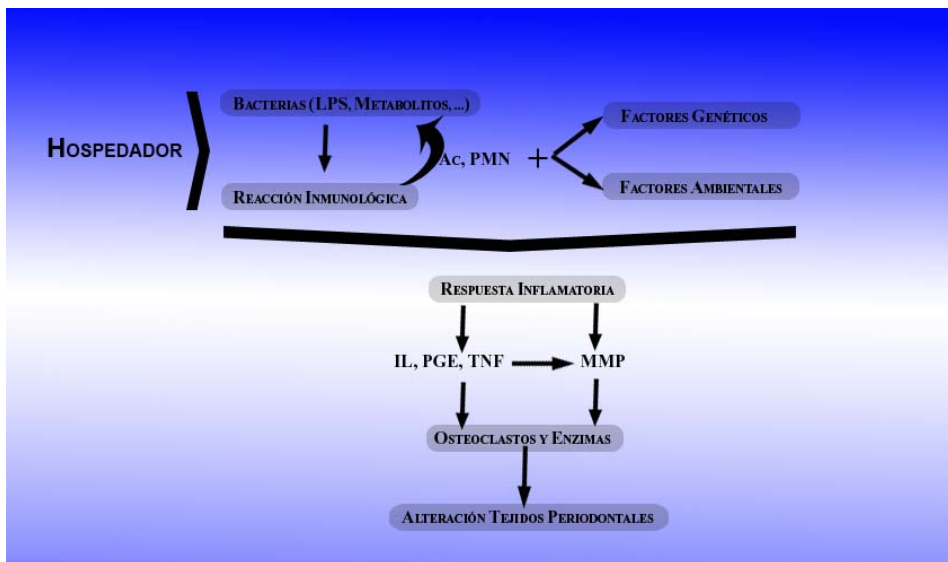


Fig. 5: Esquema de la etiopatogenia de la enfermedad periodontal.

- Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 2135-2146.
- Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52: 841-849.
- Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 2001; 25: 8-20.
- Zambon JJ, Haraszthy VI, Hariharan G, Lally ET, Demuth DR. The microbiology of early-onset periodontitis: Association of highly toxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains with localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1996; 67: 282-290.
- Socransky S, Haffajee A. Periodontal infections. En: Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Clinical periodontology and implant dentistry*. Volume 1. 5th edition. Oxford: Blackwell Publishing LTD 2008; 207-249.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 78-111.

colonizar el medio, de evadir los mecanismos defensivos antibacterianos del hospedador y son capaces de producir sustancias que pueden iniciar directamente la destrucción tisular (AAP, 1999).

**II- Factores predisponentes o inherentes al hospedador.** A pesar de la necesidad de la presencia de las bacterias para la aparición de la enfermedad periodontal, de la mayor prevalencia de ciertos tipos de microorganismos en unos tipos de periodontitis que en otros, y del descubrimiento de dos tipos de bacterias capaces de invadir la capa superficial de los tejidos periodontales y producir un efecto directo sobre éstos, el riesgo de padecer una enfermedad periodontal no es uniforme en todas las personas, por lo que los factores inherentes al hospedador, como su sistema inmune y la reacción ante la microflora bacteriana que le rodea (determinado en su carga genética) ejercen un importantísimo papel, repercutiendo en gran parte en el origen y en la forma de evolución de la enfermedad periodontal (AAP, 1999). Así, los genes desempeñan un papel importante en la predisposición hacia

la enfermedad periodontal, ya que determinan cómo interacciona un individuo ante el medio que le rodea. Así, la cascada de mediadores inmunológicos e inflamatorios que se desarrolla en la enfermedad periodontal está regulada según los genes que se expresen en las células del individuo en reacción ante la microflora bacteriana. Por lo tanto, el conocimiento de la estructura y función de los genes cuya expresión hace que aumente la predisposición a desencadenar un determinado proceso periodontal puede servir como medio diagnóstico y terapéutico de esta enfermedad.

Gran parte de las alteraciones patológicas que ocurren en la enfermedad periodontal son claramente dependientes de la reacción que cada huésped genere ante la infección bacteriana. De hecho, la activación de los procesos inflamatorios locales puede ocurrir de distinto modo en unos casos que en otros (Page y Kornman 1997; Page *et al.*, 1997). De este modo, la liberación de los mediadores inflamatorios, el tiempo durante el cual estos mediadores actúan, así como el efecto de los mismos sobre

- 
- AAP. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol* 1999; 70: 457-470.
  - Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000 1997; 14: 9-11.
  - Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000 1997; 14: 216-248.

el periodonto, constituyen factores inherentes al hospedador que se han ligado directamente a la aparición y la progresión de la enfermedad periodontal (AAP, 1999; Okada y Murakami, 1998), destacando los siguientes:

**a) Interleuquina 1 (IL-1):**

Citoquina proinflamatoria secretada por macrófagos, linfocitos, células vasculares, células epidérmicas y fibroblastos. Posee una actividad inmune, inflamatoria, de lisis y homeostasis de tejidos, y promueve el infiltrado de células inflamatorias en los sitios de infección. Su exceso de producción local provoca un incremento en la reabsorción ósea, estimula la producción de metaloproteinasas de la matriz celular (MMP), del plasminógeno y de la síntesis de prostaglandinas. Por otro lado, la interleuquina 1 puede estimular la proliferación de los queratinocitos, los fibroblastos (y

la producción de colágeno tipo I y fibronectina por parte de éstos) y de las células endoteliales vasculares. Además, tiene una actividad sinérgica con la acción de reabsorción ósea del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y permite la llegada de células inflamatorias a los lugares de infección. Existen dos formas, IL-1 $\beta$ , la más potente, e IL-1 $\alpha$ , la más predominante en los tejidos periodontales y producida principalmente por macrófagos (AAP, 1999).

En los últimos estudios se ha demostrado una mayor expresión génica de IL-1  $\beta$  en tejidos inflamados que en sanos (Wang *et al.*, 2003), en pacientes con periodontitis agresiva que en pacientes sanos o con periodontitis crónica (Kubota *et al.*, 2001; Sørensen *et al.*, 2008), y en pacientes con periodontitis comparado con gingivitis (Honda *et al.*, 2006).

- 
- AAP. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol* 1999; 70: 457-470.
  - Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 248-266.
  - Wang PL, Ohura K, Fujii T, Oido-Mori M, Kowashi Y, Kikuchi M, Suetsugu Y, Tanaka J. DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 970-973.
  - Kubota T, Morozumi T, Shimizu K, Sugita N, Kobayashi T, Yoshie H. Differential gene expression in neutrophils from patients with generalized aggressive periodontitis. *J Periodontal Res* 2001; 36: 390-397.
  - Sørensen LK, Havemose-Poulsen A, Sonder SU, Bendtzen K, Holmstrup P. Blood cell gene expression profiling in subjects with aggressive periodontitis and chronic arthritis. *J Periodontol* 2008; 79: 477-485.
  - Honda T, Domon H, Okui T. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol* 2006; 144: 35-40.

Con respecto a la IL-1 $\alpha$  hay una mayor expresión en tejidos inflamados que en sanos (Wang *et al.*, 2003).

**b) Interlequina 6 (IL-6):** citoquina proinflamatoria producida por monocitos, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, linfocitos B, linfocitos T y queratinocitos. Una de sus funciones principales es la activación final de las células y la proliferación de células plasmáticas, dando como resultado un aumento en la producción de anticuerpos no específicos y de IL-1. Se le asocia también un papel importante en la regulación local de la remodelación ósea, estimulando la formación de osteoblastos, y parece ser esencial en la pérdida ósea por deficiencia de estrógeno (Okada y Murakami, 1998).

Se ha observado una mayor expresión en tejidos inflamados que en tejidos sanos (Wang *et al.*, 2003), ligeramente disminuido en pacientes sanos con respecto a

enfermos periodontales (Bickel *et al.*, 2001) y, teniendo en cuenta el tipo de afección periodontal, aumentada en periodontitis agresivas vs pacientes sanos (Sørensen *et al.*, 2008).

**c) Interlequina 8 (IL-8):** mediador proinflamatorio producido por fibroblastos, linfocitos, células endoteliales, y por monocitos en respuesta a lipopolisacáridos bacterianos, IL-1 y TNF- $\alpha$ . Tiene una actividad quimiotáctica y de activación sobre los neutrófilos, induciendo su extravasación a la zona de la inflamación; así como una activación selectiva de las MMPs. También produce atracción sobre linfocitos T. Se encuentra más expresado en tejidos inflamados que en sanos (Wang *et al.*, 2003).

**d) Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ):** Producido principalmente por monocitos y macrófagos activados por los lipopolisacáridos de bacterias periodontopatógenas tipo Gram negativo. Induce a los fibroblastos

- 
- Wang PL, Ohura K, Fujii T, Oido-Mori M, Kowashi Y, Kikuchi M, Suetsugu Y, Tanaka J. DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 970-973.
  - Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 248-266.
  - Bickel M, Axtelius B, Solioz C, Attstrom R. Cytokine gene expression in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 840-847.
  - Sørensen LK, Havemose-Poulsen A, Sonder SU, Bendtzen K, Holmstrup P. Blood cell gene expression profiling in subjects with aggressive periodontitis and chronic arthritis. *J Periodontol* 2008; 79: 477-485.



para la secreción de colagenasas y activa a los osteoclastos, promoviendo la reabsorción ósea y cartilaginosa. También estimula la síntesis de IL-1 y PGE2 en macrófagos latentes. Posee una acción sinérgica con la reabsorción ósea de la IL-1 (AAP, 1999).

Los últimos estudios que han analizado su expresión indican un aumento de ésta en tejidos inflamados que en sanos (Wang *et al.*, 2003), similar expresión entre periodontitis crónica y agresiva y mayor expresión en periodontitis tanto crónica como agresiva con respecto a tejidos sanos (Garlet *et al.*, 2004), y ausencia de diferencias significativas entre gingivitis y periodontitis (Honda *et al.*, 2006).

**e) Factor de crecimiento transformante beta (TGF-β):** mediador antiinflamatorio, es el inhibidor de crecimiento más potente para fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales y

linfocitos. Su acción es la de estimular la síntesis de los componentes del tejido conectivo como colágeno, fibronectina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, osteonectina y osteopontina. También evita la degradación de la matriz inhibiendo la síntesis de MMP y estimulando la producción de inhibidores de proteinasas.

**f) Prostaglandina E2 (PGE2):** Eicosanoide vasoactivo producido por monocitos y fibroblastos que induce la secreción de MMP y la reabsorción ósea.

**III- Factores ambientales o modificadores.** Un tercer componente etiológico modificador sobre la presencia y severidad de la enfermedad periodontal es el relativo a los factores ambientales que afectan al hospedador y que hacen variar su susceptibilidad hacia ésta, tales como el tabaquismo, enfermedades sistémicas, cambios hormonales,... (AAP, 1999).

- 
- AAP. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol* 1999; 70: 457-470.
  - Wang PL, Ohura K, Fujii T, Oido-Mori M, Kowashi Y, Kikuchi M, Suetsugu Y, Tanaka J. DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 970-973.
  - Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 671-679.
  - Honda T, Domon H, Okui T. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol* 2006; 144: 35-40.

En concreto, el tabaco y el alcohol han sido catalogados como factores de riesgo ambientales para la enfermedad periodontal. La cantidad de exposición al tabaco se asocia con un mayor riesgo de periodontitis así como a una mayor gravedad de ésta (AAP, 1999). Recientes estudios realizados en pacientes fumadores también han demostrado que dicha población presenta peor respuesta al tratamiento de la enfermedad periodontal que la población no fumadora, incluyendo cualquier procedimiento quirúrgico (Albandar *et al.*, 2000; Albandar y Rams, 2002; Bergström *et al.*, 2000; Johnson y Guthmiller, 2007; Tonetti, 1998). De igual modo, han sido diversos los estudios realizados sobre la relación entre la periodontitis y el consumo de

alcohol, si bien los resultados obtenidos hasta el momento no reflejan una relación del todo clara entre ambos (Jansson, 2008; Okamoto *et al.*, 2006; Tezal *et al.*, 2004).

Con respecto a la diabetes, también se ha demostrado una mayor prevalencia de periodontitis en pacientes diabéticos, así como una mayor severidad de ésta, siendo de gran importancia el control que tiene el paciente sobre la diabetes mellitus y la duración de dicha alteración metabólica (Emrich *et al.*, 1991; Pinson *et al.*, 1995). Así mismo, el grado de control de la periodontitis puede afectar al grado de control metabólico de la diabetes mellitus (Aldridge *et al.*, 1995).

- 
- AAP. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol* 1999; 70: 457-470.
  - Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, pipe and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol* 2000; 71: 1874-1881.
  - Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontology* 2000 2002; 29: 7-10.
  - Bergström J, Eliasson S, Dock J. Exposure to tobacco smoking and periodontal health. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 61-68.
  - Johnson GK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol* 2000 2007; 44: 178-94.
  - Tonetti MS. Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. *Ann Periodontol* 1998; 3: 88-101.
  - Jansson L. Association between alcohol consumption and dental health. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 379-384.
  - Okamoto Y, Tsuboi S, Suzuki S, Nakagaki H, Ogura Y, Maeda K, Tokudome S. Effects of smoking and drinking habits on the incidence of periodontal disease and tooth loss among Japanese males: a 4-yr longitudinal study. *Journal of Periodontal Research* 2006; 41: 560-566.
  - Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. Alcohol consumption and periodontal disease. The third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 484-488.
  - Emrich L, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991; 62: 123-131.
  - Pinson M, Hoffman WH, Garnick JJ, Litaker M. Periodontal disease and type I diabetes mellitus in children and adolescents. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 118-23.
  - Aldridge JP, Lester V, Watts TL, Collins A, Viberti G, Wilson R. Single-blind studies of the effects of improved periodontal health on metabolic control in type 1 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 271-275.

### 3. Histopatología

Histopatológicamente la evolución de la enfermedad periodontal se produce en tres estadios según la clasificación de Kinane y Lindhe (Kinane 2001), basada en la clasificación propuesta anteriormente por Page y Schroeder (Page y Schroeder, 1976): los dos primeros estadios que se corresponden clínicamente con una gingivitis y el tercero con una periodontitis.

**a) Lesión inicial**, producida entre los cuatro y siete días de acumulación de placa, y donde se desencadena una respuesta inflamatoria aguda. Localizada en la región del surco gingival, entre los tejidos afectados se encuentran una parte del epitelio de unión y la zona más coronal del tejido conectivo (Fig. 6). Se caracteriza por la presencia de una infiltración de polimorfonucleares neutrófilos atraídos quimiotácticamente por los constituyentes bacterianos y la acción vasodilatadora de sus productos. También se produce un infiltrado de linfocitos, predominantemente del tipo T y macrófagos en la periferia de la lesión. En la mucosa se observan cambios en las células epiteliales, alteraciones

citopáticas de los fibroblastos, cambios en el tamaño y permeabilidad vascular y degradación del colágeno.

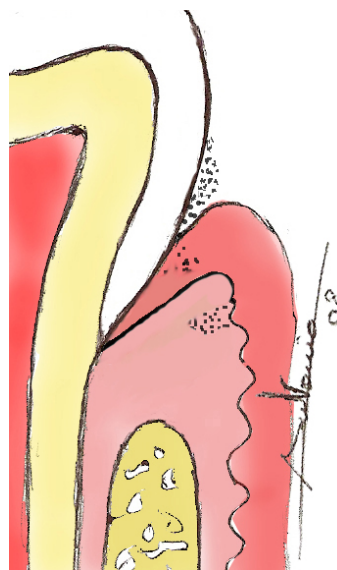


Fig. 6: Lesión inicial.

**b) Lesión establecida**, originada tras dos a tres semanas de acumulación de placa, en la que hay un mayor acúmulo inflamatorio. El área afectada es mayor que en la lesión inicial, hay una gran pérdida de colágeno, y el infiltrado se caracteriza por la presencia de células plasmáticas y linfocitos en la periferia. (Fig. 7)

**c) Lesión avanzada**, que corresponde a una periodontitis. En esta etapa además de persistir las

- Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 2001; 25: 8-20.

- Page R, Schroeder H. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 1976; 33; 235-249.

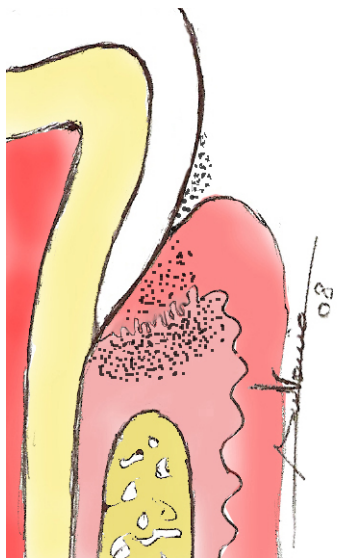


Fig. 7: Lesión establecida.

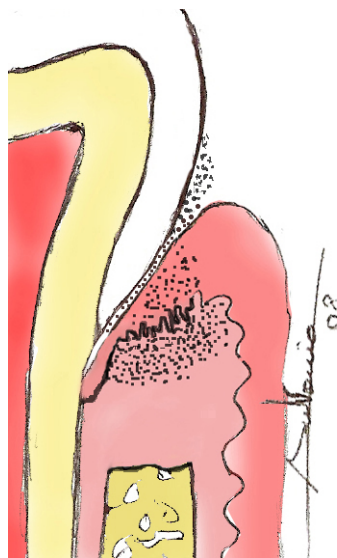


Fig. 8: Lesión avanzada.

características de la lesión establecida, aparecen lesiones en el periodonto de inserción, alterándose el ligamento periodontal y su unión con el cemento, y originándose una reabsorción del hueso alveolar. Histopatológicamente es parecida a la lesión establecida de la gingivitis, con una presencia predominante de células plasmáticas, y una variación paulatina de los linfocitos que pasan a ser mayoritariamente del tipo B. Ésta progresión a células T está dirigida por la producción de citoquinas, que son responsables del reclutamiento diferenciación y crecimiento de los tipos celulares característicos de la

progresiva cronificación de la lesión. (Fig 8)

El paso de gingivitis a periodontitis es un mecanismo que actualmente no está totalmente claro, y los factores que desencadenan el inicio de la lesión periodontal son desconocidos. En diversos estudios se ha determinado esta actividad obteniendo resultados que van desde una pérdida de inserción lenta durante periodos prolongados de actividad hasta unos episodios cortos con pérdida de inserción extremadamente rápida. (AAP, 1999)

- AAP. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. The pathogenesis of periodontal diseases. J Periodontol 1999; 70: 457-470.

#### 4. Clasificación de las enfermedades periodontales

A lo largo de la historia, desde que se definiesen los términos de gingivitis y periodontitis, las enfermedades periodontales se han clasificado de diversas formas, cuyas entidades patológicas en las cuales se subdividían han sido modificadas y ampliadas en las múltiples reuniones de consenso que se han realizado al respecto sobre la materia, a la vez que se iba avanzado en el conocimiento de las características histopatológicas, etiopatogénicas, clínicas y pronósticas de cada proceso.

La clasificación actualmente más aceptada sobre las enfermedades periodontales es la propuesta en el «Workshop» mundial de periodoncia de 1999, llevada a cabo por la Academia Americana de Periodoncia y desarrollada por Armitage (Armitage 1999). Según esta clasificación, se pueden considerar ocho tipos fundamentales de enfermedad periodontal, los cuales comprenden desde las enfermedades gingivales (gingivitis) hasta las enfermedades determinadas por condiciones y deformidades adquiridas o del desarrollo (Tabla 1).

De forma compendiada, los principales grupos a destacar de esta clasificación son:

- *Gingivitis*, diferenciada en las que se encuentran asociadas con la placa bacteriana y aquellas que no están asociadas a ésta.
- *Periodontitis crónica*, que según su extensión puede ser localizada o generalizada.
- *Periodontitis agresiva*, que de la misma forma puede clasificarse en localizada o generalizada.
- *Enfermedades periodontales necrotizantes*, que abarca a la gingivitis ulcerativa necrotizante aguda (GUNA) y a la periodontitis ulcerativa necrotizante aguda (PUNA).
- *Abscesos del periodonto*.

#### 5. Criterios diagnósticos de la enfermedad periodontal

Pese al aumento en el conocimiento sobre los factores responsables y coadyuvantes en el inicio y desarrollo de la enfermedad periodontal, su diagnóstico sigue siendo eminentemente clínico, basado fundamentalmente en el sondaje periodontal y la exploración radiográfica (AAP, 2005).

- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4: 1-6.

- AAP. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Epidemiology of periodontal diseases. *J Periodontol* 2005; 76: 1406-1419.

**I.- ENFERMEDADES GINGIVALES.**

**A) Enfermedades gingivales inducidas por la placa bacteriana\*.**

1. Gingivitis asociada sólo con placa bacteriana.
  - a. Sin otros factores locales contribuyentes.
  - b. Con factores locales contribuyentes (ver sección VIII A)
2. Enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos.
  - a. Asociadas con el sistema endocrino.
    - 1) Gingivitis asociada a la pubertad.
    - 2) Gingivitis asociada al ciclo menstrual.
    - 3) Asociadas al embarazo.
      - a) Gingivitis.
      - b) Granuloma piógeno.
    - 4) Gingivitis asociada a la diabetes mellitus.
  - b. Asociadas con discrasias sanguíneas.
    - 1) Gingivitis asociada a leucemia.
    - 2) Otras.
3. Enfermedades gingivales modificadas por medicamentos.
  - a. Enfermedades gingivales modificadas por drogas.
    - 1) Agrandamientos gingivales influidos por drogas.
    - 2) Gingivitis influidas por drogas.
      - a) Gingivitis asociadas a anticonceptivos orales.
      - b) Otras.
  4. Enfermedades gingivales modificadas por malnutrición.
    - a. Gingivitis por déficit de ácido ascórbico.
    - b. Otras.

\*Puede suceder en un periodonto sin pérdida de soporte o en un periodonto con pérdida de soporte que no está progresando.

**B. Lesiones gingivales no inducidas por placa.**

1. Enfermedades gingivales de origen bacteriano específico.
  - a. Lesiones asociadas a *Neisseria gonorrhoea*.
  - b. Lesiones asociadas a *Treponema pallidum*.
  - c. Lesiones asociadas a especies estreptocócicas.
  - d. Otras.
2. Enfermedades gingivales de origen viral.
  - a. Infecciones por herpesvirus.
    - 1) Gingivostomatitis herpética primaria.
    - 2) Herpes oral recurrente.
    - 3) Infecciones varicela-zóster.
  - b. Otras.
3. Enfermedades gingivales de origen fúngico.
  - a. Infecciones por especies *Candida*.
    - 1) Candidosis gingival generalizada.
  - b. Eritema lineal gingival.
  - c. Histoplasmosis.
  - d. Otras.
4. Lesiones gingivales de origen genético.
  - a. Fibromatosis de origen gingival.
  - b. Otras.
5. Manifestaciones gingivales de condiciones sistémicas.
  - a. Desórdenes mucocutáneos
    - 1) Liquen plano.
    - 2) Penfigoide.
    - 3) Pénfigo vulgar.
    - 4) Eritema multiforme.
    - 5) Lupus eritematoso.
    - 6) Inducidos por medicamentos.
    - 7) Otros.
  - b. Reacciones alérgicas.
    - 1) Materiales de restauración dental.
    - 2) Reacciones atribuibles a:
      - a) Pastas dentales/dentifricos.
      - b) Irrigadores orales/colutorios.
      - c) Aditivos de chicles.
      - d) Alimentos y aditivos.
    - 3) Otros.
6. Lesiones traumáticas (autolesiones, yatrogénicas, accidentales).
  - a. Lesión química.
  - b. Lesión física.
  - c. Lesión térmica.
7. Reacciones de cuerpo extraño.
8. No especificadas de otra forma.

**II. PERIODONTITIS CRÓNICA\*.**

- A. Localizada.
- B. Generalizada.

**III. PERIODONTITIS AGRESIVA\*.**

- A. Localizada.
- B. Generalizada.

\*Puede ser subclasificada de acuerdo con su extensión y gravedad. Como regla general la extensión puede considerarse como Localizada <30% de los sitios están afectados y Generalizada >30% de los sitios afectados. La gravedad se basa en la pérdida de inserción clínica (PIC): Leve PIC=162mm. Moderada PIC= 364mm. Grave PIC=5mm.

**IV. PERIODONTITIS COMO MANIFESTACIÓN DE ENFERMEDADES SISTÉMICAS.**

- A. Asociada a desórdenes hematológicos.
  1. Neutropenia adquirida.
  2. Leucemias.
  3. Otras.
- B. Asociada a desórdenes genéticos.
  1. Neutropenia familiar cíclica.
  2. Síndrome de Down.
  3. Síndromes de déficits en la adhesión de los leucocitos.
  4. Síndrome de Papillon-Lefevre.
  5. Síndrome de Chediak-Higashi.
  6. Síndromes de histiocitosis.
  7. Enfermedades del almacenamiento de glucógeno.
  8. Agranulocitosis infantil genética.
  9. Síndrome de Cohen.
  10. Síndrome de Ehlers-Danlos (Tipos IV y VIII).
  11. Hipofosfatasia.
  12. Otras.
- C. No especificadas de otra forma.

**V. ENFERMEDADES PERIODONTALES NECROTIZANTES.**

- A. Gingivitis necrotizante ulcerativa (GUN).
- B. Periodontitis necrotizante ulcerativa (PUN).

**VI. ABCESOS DEL PERIODONTO.**

- A. Absceso gingival.
- B. Absceso periodontal.
- C. Absceso pericoronal.

**VII. PERIODONTITIS ASOCIADAS CON LESIONES ENDODÓNTICAS.**

- A. Lesiones combinadas periodontales - endodónticas.

**VIII. CONDICIONES Y DEFORMIDADES ADQUIRIDAS O DEL DESARROLLO.**

- A. Factores localizados relacionados con el diente que modifican o predisponen a la presencia de enfermedades gingivales /periodontitis inducidas por la placa.
  1. Factores anatómicos del diente.
  2. Restauraciones/aparatología dental.
  3. Fracturas radiculares.
  4. Reabsorción radicular cervical y desgarros de cemento.
- B. Deformidades y condiciones mucogingivales alrededor de los dientes.
  1. Recesión gingival/tejido blando.
    - a) Superficies vestibulares o linguales.
    - b) Interproximal (papilar).
  2. Falta de encía queratinizada.
  3. Profundidad del vestibulo disminuida.
  4. Frenillo aberrante/posición muscular.
  5. Exceso gingival.
  6. Color anormal.
- C. Condiciones y deformidades mucogingivales en crestas desdentadas.
  1. Cresta vertical y/o horizontal deficiente.
  2. Falta de encía/tejido queratinizado.
  3. Agrandamiento gingival/de tejido blando.
  4. Frenillo aberrante/posición muscular.
  5. Disminución de la profundidad del vestibulo.
  6. Color no normal.
- D. Trauma oclusal.
  1. Trauma oclusal primario.
  2. Trauma oclusal secundario.

Tabla 1: Clasificación de las enfermedades periodontales.

Habitualmente, la enfermedad periodontal se presenta de forma clínica como un proceso inflamatorio sangrante que afecta a los tejidos que rodean y soportan al diente, y que puede desembocar en la pérdida de inserción del diente y la avulsión del mismo.

Por ello, a la hora de realizar el examen periodontal clínico habitual de los tejidos periodontales se deben tener presentes la aparición de signos de inflamación gingival (como el sangrado gingival espontáneo o al sondaje), la presencia de bolsas periodontales, la existencia de recesiones, la pérdida de inserción y la pérdida ósea (valorando el grado de pérdida así como el patrón de las lesiones óseas). Igualmente, habría que valorar la historia dental (incluyendo la medicación), así como la presencia o ausencia de otros signos y síntomas como dolor, ulceraciones, etc. (AAP, 2003). Todos estos signos y síntomas de la enfermedad periodontal se han de

valorar desde un punto de vista clínico, con el grado de subjetividad que ello conlleva.

Aparte del examen periodontal clínico habitual, se han desarrollado otras técnicas coadyuvantes a éste que permiten, no sólo completar el diagnóstico, sino también como herramientas que ayuden en el establecimiento de un pronóstico sobre el comportamiento futuro de la enfermedad periodontal, como son las sondas térmicas (Kung *et al.*, 1990), la identificación bacteriana por métodos enzimáticos (Loesche, 1986), las sondas de ADN (Söder *et al.*, 1994; Tanner *et al.*, 1998; Tay *et al.*, 1992), los test microbiológicos, los marcadores antigénicos, etc (AAP, 2003). Sin embargo, hasta el momento, no se ha desarrollado ningún sistema que nos permita diagnosticar y clasificar la enfermedad periodontal de manera objetiva y automatizada, lo cual hace necesario investigar en este campo.

- 
- AAP. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol* 2003; 74: 1237-1247.
  - Kung RT, Ochs B, Goodson JM: Temperature as a periodontal diagnostic. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 557-563.
  - Loesche WJ. The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1: 65-72.
  - Söder P-Ö, Jin LJ, Söder LJ. DNA probe detection of periodontopathogens in advanced periodontitis. *Scand J Dent Res* 1993; 101: 363-370.
  - Tanner ACR, Maiden MFJ, Zambon JJ, Thoren GS, Kent RL Jr. Rapid chair-side DNA probe assay of *Bacteroides forsythus* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res* 1998; 33: 105-117.
  - Tay F, Liu YB, Flynn MJ, Slots J. Evaluation of a non-radioactive DNA probe for detecting *Porphyromonas gingivalis* in subgingival specimens. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 344-348.







OBJETIVOS



Tras la revisión de la estructura de los tejidos periodontales, la patogenia de la enfermedad periodontal y su relación con los distintos mediadores pro y antiinflamatorios, y debido a:

- La escasa literatura referente a la expresión génica de dichos mediadores y de otros que pudieran jugar un papel en la misma.

- La importancia que la identificación de dichos mediadores pudieran tener no sólo en el mejor conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad periodontal, sino también en el diagnóstico y evolución de la misma.

Se establece como **objetivo principal** de esta Tesis Doctoral:

- Estudiar mediante microarray de oligonucleótidos la expresión de los genes en especímenes de encía sana y con alteración periodontal.

Para ello se han determinado los siguientes **objetivos específicos**:

- 1-** Determinar el perfil de expresión génica global de la encía clínicamente sana mediante microarrays de oligonucleótidos.

- 2-** Determinar el perfil de expresión génica global de la encía de pacientes con alteración periodontal mediante microarrays de oligonucleótidos.

- 3-** Identificar los genes y funciones génicas que se expresan de forma diferencial en la encía clínicamente sana y en la encía de pacientes con alteración periodontal.

- 4-** Desarrollar un algoritmo diagnóstico basado en los niveles de expresión génica determinados mediante microarrays.





## MATERIAL Y MÉTODOS



## 1 Material

Para la obtención de las muestras se utilizó el siguiente instrumental:

- Historia clínica general.
- Periodontograma.
- Espejo nº 5 (Hu-Friedy Mfg. Co., Inc. Alemania).
- Sonda periodontal informatizada Florida Probe® (Florida Probe Corporation® EE.UU).
- Vial de anestesia 1'8 ml Articaina con Epinefrina 1/200.000 (Ultracain® 0'5%. Normon®).
- Jeringa de anestesia Carpule® 1'8 ml (Heraeus Kulzer®, Alemania).
- Agujas estériles para Carpule 0'3 mm x 12 mm (Heraeus Kulzer®, Alemania).
- Mango de bisturí nº 5 (Hu-Friedy Mfg. Co., Inc. Alemania).
- Hoja de bisturí nº 15-C (Hu-Friedy Mfg. Co., Inc. Alemania).
- Pinzas Adson Perma Sharp® 12 cm de tungsteno para tejidos con parte activa atraumática. (Hu-Friedy Mfg. Co., Inc. Alemania).

Para el análisis de las muestras mediante el sistema de *Microarray* de Affymetrix se utilizó el siguiente material:

- Sistema de extracción de ARN total Qiagen RNeasy System®

(Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá).

- Gel de agarosa 1'2%.
- Tinción de bromuro de etidio.
- Sistema de análisis Agilent® (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, EE.UU.).
- Transcriptasa inversa (Superscript II, Life Technologies, Inc., Carlsbad, California, EE.UU.).
- Oligonucleótidos ricos en colas de timina (T7-polyT primer).
- UTP y CTP marcados con biotina (Enzo Diagnostics, Farmingdale, Nueva York, EE.UU.).
- Chips del sistema de *Microarray* Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0®

## 2 Método

### I- Método de obtención de las muestras.

El presente estudio se ha realizado en las clínicas que posee la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada y en clínica privada de Granada, y el análisis en los laboratorios del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Granada. Los pacientes explorados en ambas clínicas fueron seleccionados de forma aleatoria, escogiendo para el estudio aquellos pacientes que cumpliesen con los criterios de inclusión y exclusión determinados al efecto.

**a) Criterios de inclusión**

- Pacientes exentos de cualquier enfermedad sistémica.
- Pacientes no tratados con medicación alguna que pudiese interferir en la expresión de mediadores pro o antiinflamatorios.
- Muestras ortotípicas sanas determinadas clínicamente con ausencia de inflamación y sin sangrado al sondaje.
- Muestras inflamadas, determinadas clínicamente mediante la presencia de bolsas periodontales y sangrado al sondaje.
- Zonas de obtención de las muestras libres de otras patologías orales (p.ej. caries o mucositis) que pudieran alterar la expresión génica.

**b) Criterios de exclusión**

- Todos aquellos que no cumplan los requisitos numerados en el apartado anterior.
- Pacientes fumadores habituales.

Una vez confirmado el paciente como apto para su inclusión en el estudio se le informa del cometido del estudio y se le solicita su aceptación en la inclusión en éste, firmando en tal caso el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de Granada (Fig. 9 y 10).

Las muestras de encía normal se obtuvieron por motivos de extracción de dientes o restos radiculares incluidos, extracciones por motivos ortodóncicos, fenestración o tracción de dientes retenidos, plastia de frenillos labiales, extirpación de quistes maxilares y pequeños tumores de los mismos o del resto de la cavidad oral, implantes dentarios y preparación de los tejidos para prótesis. Las muestras de encía con alteración periodontal se tomaron del tratamiento quirúrgico de la enfermedad periodontal.

Al término del proceso de selección se obtuvieron 13 muestras de un tamaño medio de 8 mm<sup>3</sup> válidas para ser incluidas en el estudio, 6 muestras

Muestra	Edad	Sexo	Región
G8	30	♀	Molar 2º cuadrante
G24	50	♀	Premolar 1 <sup>er</sup> cuadrante
G27	42	♀	Premolar 4º cuadrante
G35	42	♂	Molar 2º cuadrante
G49	77	♂	Molar 1 <sup>er</sup> cuadrante
G62	78	♂	Premolar 3 <sup>er</sup> cuadrante
N = 6	Media: 53'17 años Rango de edad: 30-78	Hombres = 50% Mujeres = 50%	

Tabla 2: Características de las muestras de mucosa oral sana.



(de 3 hombres y 3 mujeres) de mucosa oral sana (grupo control) y 7 muestras (4 hombres y 3 mujeres) de mucosa oral con alteración periodontal (grupo periodontal) (Tablas 2 y 3).

La edad de los pacientes donantes de mucosa oral sana osciló entre los 30 y los 78 años (media de 53'17 años), mientras que la edad de los donantes de mucosa oral con alteración periodontal estaba comprendida entre los 26 y los 67 años (media de 47'14 años) (Tablas 2 y 3).

A todos los pacientes se les realizó una historia clínica general que incluía:

Datos identificativos.

Existencia o no de enfermedades sistémicas.

Medicación que recibe el paciente o ha recibido en las dos últimas semanas.

Alergias que padece.

Tras ello se les realiza una exploración intraoral, consistente en una exploración general del aspecto de la encía, color, tamaño, presencia de cálculo supra y subgingival; y en un sondaje periodontal clínico habitual, cumplimentando un periodontograma completo donde se recoge la presencia de bolsas periodontales, recesiones, movilidad, sondaje de las furcas y registrando el índice gingival que presenta el paciente, en el caso de este estudio el índice gingival de Ainamo y Bay (Ainamo y Bay, 1975) para determinar el grado de actividad del proceso periodontal.

Se determina clínicamente el tipo de encía para su catalogación en el «grupo periodontal» o en el «grupo control» y se procede a la anestesia loco-regional de la zona circundante del tejido que se va a tomar como biopsia con Articaína 0'5% y se realiza la escisión del tejido mediante bisturí

Muestra	Edad	Sexo	Región
G1	67	♂	Canina 4º cuadrante
G2	67	♂	Molar 1 <sup>er</sup> cuadrante
G10	35	♀	Molar 1 <sup>er</sup> cuadrante
G51	51	♀	Molar 1 <sup>er</sup> cuadrante
G105	37	♂	Premolar 1 <sup>er</sup> cuadrante
G119	47	♂	Molar 2º cuadrante
F1	26	♀	Premolar 2º cuadrante
N = 7	Media: 47'14 años Rango de edad: 26-67	Hombres = 57'14% Mujeres = 42'86%	

Tabla 3: Características de las muestras de mucosa oral con alteración periodontal.

- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. International Dental Journal 1975; 25: 229-235.

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

D/Dña....., con DNI.....

Manifiesta estar informado de la realización del proyecto de Investigación, de título ***Identificación de genes específicos de enfermedad periodontal mediante microarray*** que se desarrolla en las facultades de Medicina y Odontología de Granada, en los departamentos de Histología y Estomatología.

He sido informado de que participar en dicho Proyecto de Investigación, no supone ningún riesgo para mi salud, sino que supone todo lo contrario ya que permite conocer posibles problemas que de otra forma sería difícil conocer y así orientar a su resolución.

Por lo que doy **MI CONSENTIMIENTO** para que se utilice mi participar como unidad de estudio de las previstas en dicho proyecto, de acuerdo a la información que me ha sido presentada, quedando libre para desistir del mismo en cualquier momento.

Fecha

Firma

Fig. 9: Modelo de consentimiento informado utilizado.

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

La cirugía oral/ periodontal se realiza para resolver determinados problemas de la cavidad oral tales como: extracción de dientes o restos radiculares incluidos, fenestración o tracción de dientes retenidos, plastia de frenillos labiales, extirpación de quistes maxilares y pequeños tumores de los mismos o del resto de la cavidad oral, implantes dentarios, tratamiento de la enfermedad periodontal y preparación de los tejidos para prótesis fundamentalmente. La intervención se realizará con anestesia local (con los riesgos inherentes a ella), y que los fármacos utilizados pueden producir determinadas alteraciones del nivel de conciencia por lo que no podré realizar determinadas actividades inmediatamente, tales como conducir un vehículo. Todos estos procedimientos suponen un indudable beneficio, si bien no están exentos de algunas complicaciones, algunas de ellas inevitables, tales como:

- Alergia al anestésico u otro medicamento utilizado antes, durante o después de la cirugía.
- Hematoma y edema de la región.
- Dehiscencia de la sutura.
- Daño de dientes adyacentes.
- Hipoestesia o anestesia del nervio dentario inferior, temporal o definitiva.
- Hipoestesia o anestesia del nervio lingual, temporal o definitiva.
- Hipoestesia o anestesia del nervio infraorbitario, temporal o definitiva.
- Infección postoperatoria.
- Osteítis.
- Sinusitis.
- Comunicación oronasal y /u orosinusal.
- Fracturas óseas.
- Rotura de instrumentos.

Recibida la anterior información, considero que he comprendido la naturaleza y propósitos del procedimiento:

.....  
Además en entrevista personal con el Dr. ....  
he sido informado/a en términos asequibles, del alcance del tratamiento. En la entrevista he tenido la oportunidad de proponer y resolver mis posibles dudas, y de obtener cuanta información complementaria he creído necesaria. Por ello me considero en condiciones de ponderar debidamente tanto sus posibles riesgos como la utilidad y beneficios que de él puedo obtener. Asimismo se me ha expuesto que si durante el acto quirúrgico, el estomatólogo u odontólogo considera que existe algún material hístico sobrante, con mi consentimiento, el mismo podrá ser utilizado con fines de investigación.

Por lo que doy **MI CONSENTIMIENTO** para que se realice la intervención arriba indicada y se utilice el tejido extraído para la investigación, quedando libre para desistir del mismo en cualquier momento.

Fecha

Firma

Fig. 10: Modelo de consentimiento informado utilizado.

del número 15-C y pinzas Adson atraumáticas, introduciéndose en un tubo Eppendorf con una solución protectora y estabilizadora de las cadenas de ARN para evitar la degradación de éste (RNAlater<sup>®</sup>, Applied Biosystems), conservándose a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

## **II- Método de análisis de expresión génica mediante *Microarray*.**

Una vez obtenidas las muestras se procesan para su estudio mediante *Microarray* siguiendo el siguiente método:

Para el análisis de expresión génica se extrajo el ARN total de cada una de las muestras normales y con afección periodontal utilizando el sistema comercial Qiagen RNeasy System<sup>®</sup> (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá). Una vez extraído el ARN, se comprobó su integridad y su calidad mediante visualización directa del ARN ribosómico de 28 y 18S en ARN total separado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1'2% y tinción con bromuro de etidio, así como mediante el sistema de análisis Agilent<sup>®</sup> (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, EE.UU.).

Una vez purificado el ARN total, todos los ARNm fueron transformados en ADNc mediante una transcriptasa inversa (Superscript II, Life Technologies,

Inc., Carlsbad, California, EE.UU.) utilizando un oligonucleótido rico en colas de timina (T7-polyT primer), el cual permitió la amplificación de cualquier ARN mensajero presente en la célula. A continuación, se sintetizaron los ARNc correspondientes a todos los ADNc mediante transcripción «*in Vitro*», utilizando para ello UTP y CTP marcados con biotina (Enzo Diagnostics, Farmingdale, Nueva York, EE.UU.). Una vez sintetizados, y para favorecer la hibridación, estos ARNc se fragmentaron químicamente añadiendo una concentración elevada de sales y altas temperaturas.

Finalmente, los ARNc marcados y fragmentados se hibridaron frente a los chips que constituyen el sistema de *Microarray* Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0<sup>®</sup> de la casa comercial Affymetrix<sup>®</sup>, durante 16 horas a 45 °C. Tras un proceso totalmente estandarizado y automatizado, los chips se lavaron y se escanearon para obtener valores absolutos de expresión génica expresados en una escala arbitraria de unidades fluorescentes (u.f.). Todos los valores de expresión se normalizaron utilizando el programa informático suministrado por la casa comercial Affymetrix<sup>®</sup>.

Tras ellos se procedió al análisis de los resultados obtenidos y a la comparación de ambos grupos de estudio.

### III- Método de análisis estadístico.

Una vez analizadas las muestras mediante *Microarray* se calculó la media y la desviación estándar para cada gen y para cada grupo de estudio (mucosa oral normal y mucosa oral con afección periodontal). Posteriormente se seleccionaron aquellos genes y secuencias génicas (EST) cuya expresión media fuese superior a 5000 unidades fluorescentes (u.f.) de Affymetrix® en cada grupo de estudio, considerando que esta expresión correspondía a genes altamente expresados y, por tanto, tenían significación biológica. A continuación se calculó la expresión relativa de las muestras con enfermedad periodontal respecto a las muestras control dividiendo la expresión media de las primeras entre la expresión media de estas últimas (*fold-change*).

Para determinar el perfil genético funcional existente en las muestras de mucosa oral normal y de mucosa oral con enfermedad periodontal se utilizaron los programas informáticos *BiNGO*® y *Cytoscape*® (Boyer et al., 2006; Maere et al., 2005). Estos programas permiten identificar aquellas funciones génicas que son especialmente abundantes en el conjunto de genes seleccionados, calculando un valor estadístico  $p$  de acuerdo con una distribución hipergeométrica. De este modo, el valor  $p$  calculado indica la posibilidad de que tal enriquecimiento génico funcional ocurra por simple azar.

Para identificar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio se utilizó el test estadístico  $t$  de Student, considerándose significativos aquellos valores  $p$  que resultaron menores de 0'05 en los tests de doble cola.

---

- Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 2006; 441: 349-353.

- Maere, S., Heymans, K. and Kuiper, M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* 2005; 21: 3448-3449.





RESULTADOS





## 1. Determinación de perfiles de expresión en cada grupo

### I- Genes y funciones génicas expresadas en el grupo control (mucosa oral normal).

El análisis de genes que mostraban sobreexpresión en el grupo de muestras de periodonto normal reveló la existencia de 353 genes/EST sobreexpresadas en este grupo (Tabla 4).

Cuando se analizaron los 353 genes/EST que mostraron sobreexpresión en el grupo control se comprobó que éstos pertenecían a 105 funciones celulares identificables por el programa Cytoscape-BiNGO (Tabla 5), los cuales se representan gráficamente en la Figura 13. De estas 105 funciones, 28 (26'667% del total) son constituyentes celulares, 33 (31'429%) son funciones de metabolismo y función celular, 6 (5'714%) pertenecen a funciones del sistema inmune, 15 (14'286%) son funciones relacionadas con la diferenciación celular, 11 (10'476%) funciones de biosíntesis, 8 (7'619%) uniones intercelulares, y 4 (3'809%) se relacionan con otras funciones (Fig. 11). En concreto, las funciones identificadas son:

### Constituyentes celulares

- Constituyente estructural del ribosoma
- Constituyente estructural del citoesqueleto
- Componente celular
- Intracelular
- Célula
- Citoplasma
- Citosol
- Ribosoma citosólico (*sensu* Eucariota)
- Ribosoma
- Subunidad grande de ribosoma citosólico (*sensu* Eukaryota)
- Subunidad pequeña de ribosoma citosólico (*sensu* Eukaryota)
- Citoesqueleto
- Filamento intermedio
- Subunidad grande ribosómica
- Subunidad pequeña ribosómica
- Complejo ribonucleoproteínico
- Organela
- Organela no unida a membrana
- Organela intracelular
- Organela intracelular no unida a membrana
- Parte de organela
- Parte intracelular
- Parte citoesquelética
- Parte citoplásmica
- Parte citosólica
- Parte de organela intracelular
- Parte celular
- Filamento intermedio del citoesqueleto

### Metabolismo y función celular

- Función molecular
- Unión ácido nucléico
- Unión ARN

- Actividad inhibidora de enzima
- Actividad inhibidora de endopeptidasa
- Actividad inhibidora de endopeptidasa tipo serina
- Actividad molecular estructural
- Unión fosfolipídica calcio dependiente
- Compleco proteínico Arp2/3
- Elongación traslacional
- Proceso fisiológico
- Actividad del factor de traslación, unión ácido nucleico
- Unión poly(A)
- Proceso biológico
- Proceso fisiológico celular
- Metabolismo
- Actividad del factor de elongación traslación
- Actividad inhibidora de la protein quinasa C
- Biosíntesis de macromolécula
- Entrecruzamiento peptídico
- Metabolismo de proteína
- Unión ARNr

- Actividad inhibidora de proteasa
- Unión proteínica, puente
- Ciclo descamativo
- Traslación
- Metabolismo de macromolécula
- Complejo proteínico
- Metabolismo celular
- Metabolismo primario
- Metabolismo de macromolécula celular
- Metabolismo de proteína celular
- Actividad reguladora de la traslación

### Sistema inmune

- Unión de antígeno
- Presentación de antígeno
- Presentación de antígeno, antígeno endógeno
- Procesamiento de antígeno, antígeno endógeno vía MHC clase I
- Actividad receptor MHC clase I
- Procesamiento de antígeno

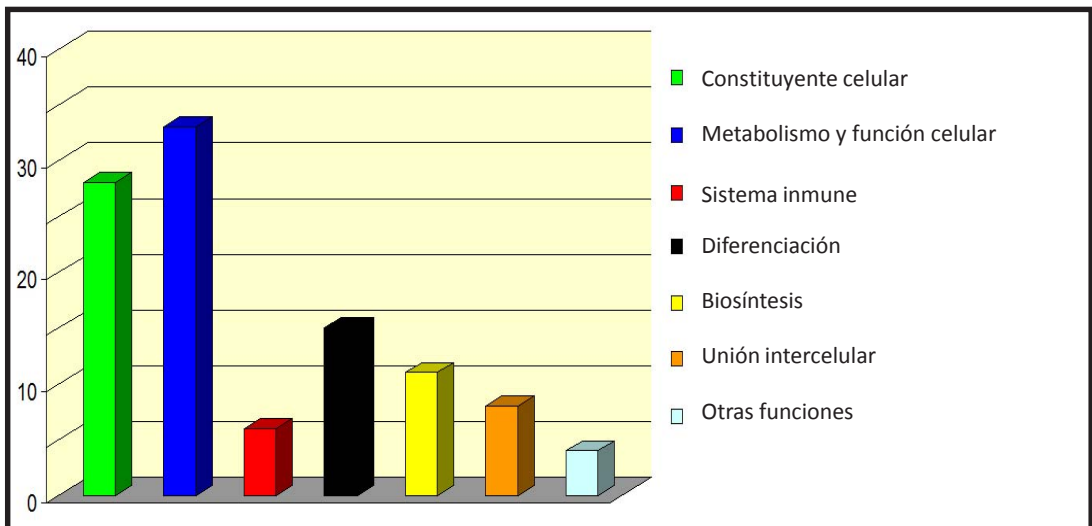


Fig. 11: Gráfico de las funciones de los genes/EST sobreexpresados en las muestras sanas.

## Diferenciación

- Envoltorio cornificado
- Desarrollo de folículo piloso
- Desarrollo
- Desarrollo de ectodermo
- Desarrollo de hemocito (*sensu* Artropodo)
- Desarrollo de epidermis
- Desarrollo tisular
- Diferenciación de célula epidérmica
- Diferenciación celular
- Diferenciación queratinocítica
- Queratinización
- Diferenciación de célula pilosa
- Ciclo piloso
- Morfogénesis de tejido
- Morfogénesis de epidermis

## Biosíntesis

- Biosíntesis de proteína
- Biogénesis y organización de organela
- Biogénesis y organización de citoesqueleto
- Biogénesis y organización de citoplasma
- Biosíntesis
- Biogénesis y organización de la célula
- Complejo eucariótico 43S de preiniciación
- Complejo eucariótico 48S de iniciación
- Ensamblado y biogénesis de ribosoma
- Ensamblado de ribosoma
- Biosíntesis celular

## Unión intercelular

- Actividad de las uniones comunicantes formadores del canal
- Unión intercelular
- Uniones comunicantes
- Complejo conexón
- Ensamblado de unión intercelular

- Actividad del conexón del canal
- Unión de célula
- Ensamblado y mantenimiento de unión intercelular

## Otras funciones

- Motilidad celular
- Implantación del embrión
- Locomoción
- Localización de la célula

## II- Genes y funciones génicas expresadas en el grupo periodontal (mucosa oral con enfermedad periodontal).

El análisis de los genes sobreexpresados en el grupo de muestras con enfermedad periodontal denotó la existencia de 345 genes/EST sobreexpresados en dicho grupo (Tabla 4).

Al analizar estos 345 genes/EST sobreexpresados en este grupo, se evidenció que éstos pertenecían a 96 funciones celulares identificables por el programa Cytoscape-BINGO (Tabla 5), representados gráficamente en la Figura 14. De ellas, 28 (29'167%) son constituyentes celular, 29 (30'208%) son funciones de metabolismo y función celular, 7 (7'292%) conciernen al sistema inmune, 16 (16'667%) son funciones relacionadas con la diferenciación celular, 11 (11'458%) se corresponden con funciones de biosíntesis, y 5 (5'208%) con uniones intercelulares (Fig. 12).

De forma agrupada, las funciones identificadas son:

### Constituyentes celulares

- Constituyente estructural del ribosoma
- Constituyente estructural del citoesqueleto
- Componente celular
- Intracelular
- Célula
- Citoplasma
- Citosol
- Ribosoma citosólico (*sensu* Eucariota)
- Ribosoma
- Subunidad grande de ribosoma citosólico (*sensu* Eukaryota)
- Subunidad pequeña de ribosoma citosólico (*sensu* Eukaryota)
- Citoesqueleto
- Filamento intermedio
- Subunidad grande ribosómica
- Subunidad pequeña ribosómica
- Complejo ribonucleoproteínico
- Organela
- Organela no unida a membrana

- Organela intracelular
- Organela intracelular no unida a membrana
- Parte de organela
- Parte intracelular
- Parte citoesquelética
- Parte citoplásmica
- Parte citosólica
- Parte de organela intracelular
- Parte celular
- Filamento intermedio del citoesqueleto

### Metabolismo y función celular

- Función molecular
- Unión ARN
- Actividad inhibidora de enzima
- Actividad inhibidora de fosfolipasa
- Actividad molecular estructural
- Unión fosfolipídica calcio dependiente
- Complejo proteínico Arp2/3
- Elongación traslacional
- Proceso fisiológico
- Actividad del factor de traslación, unión ácido nucleico
- Unión poly(A)

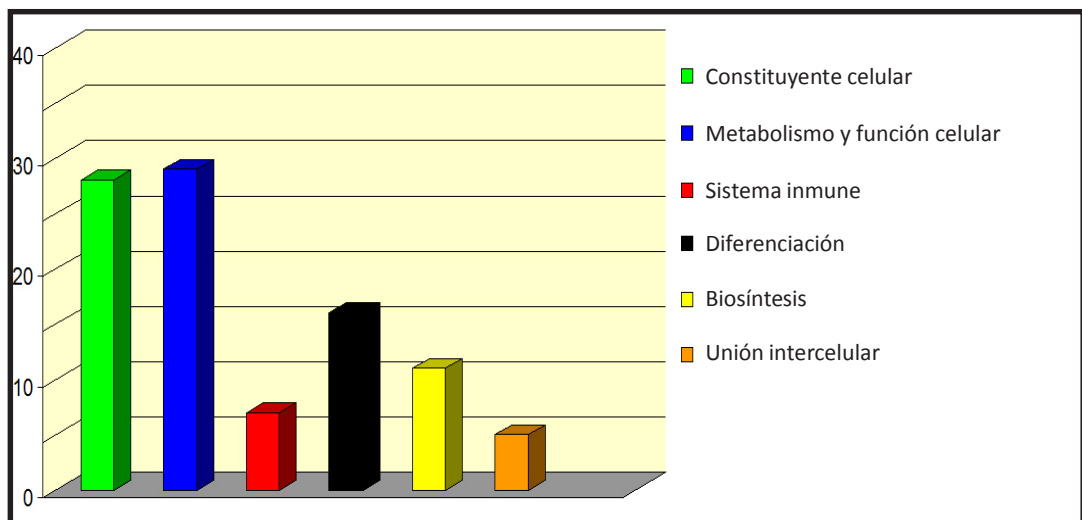


Fig. 12: Gráfico de las funciones de los genes/EST sobreexpresados en las muestras con alteración periodontal

- Proceso biológico
- Proceso fisiológico celular
- Metabolismo
- Actividad del factor de elongación traslación
- Biosíntesis de macromolécula
- Proceso celular
- Entrecruzamiento peptídico
- Metabolismo de proteína
- Unión ARNr
- Unión proteínica, puente
- Ciclo descamativo
- Traslación
- Metabolismo de macromolécula
- Complejo proteínico
- Metabolismo celular
- Metabolismo primario
- Metabolismo de macromolécula celular
- Metabolismo de proteína celular
- Actividad reguladora de la traslación

### **Sistema inmune**

- Unión de antígeno
- Presentación de antígeno
- Presentación de antígeno, antígeno endógeno
- Procesamiento de antígeno, antígeno endógeno vía MHC clase I
- Actividad receptor MHC clase I
- Procesamiento de antígeno

### **Diferenciación**

- Envoltorio cornificado
- Desarrollo de folículo piloso
- Desarrollo de ectodermo
- Desarrollo de hemocito (*sensu* Artrópodo)

- Desarrollo de epidermis
- Desarrollo tisular
- Diferenciación de célula epidérmica
- Diferenciación celular
- Diferenciación queratinocítica
- Constituyente estructural de epidermis
- Queratinización
- Diferenciación de célula pilosa
- Diferenciación de hemocito (*sensu* Artrópodo)
- Ciclo piloso
- Morfogénesis de tejido
- Morfogénesis de epidermis

### **Biosíntesis**

- Complejo del factor 1 eucariótico de elongación de la traslación
- Biosíntesis de proteína
- Biogénesis y organización de organela
- Biogénesis y organización de citoesqueleto
- Biogénesis y organización de citoplasma
- Biosíntesis
- Complejo eucariótico 43S de preiniciación
- Complejo eucariótico 48S de iniciación
- Ensamblado y biogénesis de ribosoma
- Ensamblado de ribosoma
- Biosíntesis celular

### **Unión intercelular**

- Actividad de las uniones comunicantes formadores del canal
- Unión intercelular
- Uniones comunicantes
- Complejo conexón
- Actividad del conexón del canal

## 2. Análisis comparativo

El análisis estadístico de los genes cuya expresión era significativamente diferente en el grupo control en comparación con el grupo de muestras periodontales reveló la existencia de 96 genes/EST diferencialmente expresados (Tabla 6). De ellos, 54 genes/EST mostraron sobreexpresión estadísticamente significativa en el grupo de perio, mientras que 42 genes/EST se encontraron sobreexpresados en el grupo control.

## 3. Algoritmo clasificadorio

De los 54.613 genes/EST analizados en esta Tesis Doctoral, se

seleccionaron 66 genes/EST por su expresión superior en todas muestras de uno de los grupos frente a las del otro grupo (Tabla 7). Cuando se utilizaron estos genes/EST para clasificar las muestras atendiendo a sus niveles de expresión, se comprobó que las 6 muestras correspondientes a la mucosa oral normal se clasificaban juntas en una misma rama del árbol clasificadorio, mientras que las otras 6 se agrupaban en la otra rama (Figura 15). La inclusión de una muestra independiente utilizada como control para la validación del sistema demostró la validez de los 66 genes/EST previamente seleccionados, los cuales permitieron clasificar correctamente esta muestra independiente como muestra periodontal (Figura 16).

Referencia Affymetrix	Símbolo del gen	Nombre del gen	Media de expresión CTR	Media de expresión PERIO	Media relativa PERIO/CTR
200801_x_at	ACTB	actin, beta	11076,0	10850,6	0,979649601
213867_x_at	ACTB	actin, beta	10149,9	9866,9	0,972116218
224594_x_at	ACTB	actin, beta	10324,5	9857,6	0,954772628
201550_x_at	ACTG1	actin, gamma 1	9988,7	9632,5	0,964342862
211970_x_at	ACTG1	actin, gamma 1	9284,8	9432,9	1,015952596
211983_x_at	ACTG1	actin, gamma 1	10308,5	10360,6	1,00505734
211995_x_at	ACTG1	actin, gamma 1	9468,2	9701,2	1,024606887
212363_x_at	ACTG1	actin, gamma 1	7814,9	8455,5	1,081982806
212988_x_at	ACTG1	actin, gamma 1	9637,5	9564,4	0,99241329
213214_x_at	ACTG1	actin, gamma 1	10029,6	10019,5	0,998987999
221607_x_at	ACTG1	actin, gamma 1	10616,2	10680,7	1,006077181
224585_x_at	ACTG1	actin, gamma 1	10751,0	10703,0	0,995539936
213101_s_at	ACTR3	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)	5366,2	5061,8	0,943268535
206561_s_at	AKR1B10 /// LOC340888	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)	6812,4	4482,5	0,657988863
214687_x_at	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate	5211,3	4600,8	0,882847905
201012_at	ANXA1	annexin A1	13807,1	13709,2	0,992907022
201590_x_at	ANXA2	annexin A2	8852,3	8090,1	0,913894642
210427_x_at	ANXA2	annexin A2	8877,2	8006,5	0,901919333
213503_x_at	ANXA2	annexin A2	8281,6	7900,2	0,95393814
203074_at	ANXA8 /// ANXA8L1	annexin A8 /// annexin A8-like 1	6124,0	5092,0	0,831486758
39248_at	AQP3	aquaporin 3 (Gill blood group)	13572,5	12444,1	0,916858742
208679_s_at	ARPC2	actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 34kDa	6637,0	7137,1	1,075350877
1553567_s_at	ATP13A5	ATPase type 13A5	11381,2	10818,0	0,950513275
213738_s_at	ATP5A1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	5598,8	5493,1	0,98111208
201891_s_at	B2M	beta-2-microglobulin	10558,8	10395,3	0,98451684
216231_s_at	B2M	beta-2-microglobulin	10448,2	10532,9	1,00810985
208517_x_at	BTF3	basic transcription factor 3	6161,1	5382,1	0,873564587
211939_x_at	BTF3	basic transcription factor 3	6819,6	6063,2	0,889084404
229152_at	C4orf7	chromosome 4 open reading frame 7	7641,3	10388,0	1,359452362
207243_s_at	CALM2	calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)	5605,4	5785,4	1,032117934
221791_s_at	CCDC72	coiled-coil domain containing 72	6843,7	6139,5	0,897102695
208650_s_at	CD24	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	8148,9	7843,4	0,962516337
208651_x_at	CD24	CD24 molecule	4897,7	5094,9	1,040256854
209771_x_at	CD24	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	12207,6	10751,1	0,880689956
216379_x_at	CD24	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	12574,9	11075,7	0,880773232
266_s_at	CD24	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	5977,8	6278,9	1,050369842
201005_at	CD9	CD9 molecule	5709,0	5214,5	0,913385551
200021_at	CFL1	cofilin 1 (non-muscle)	7655,5	7028,7	0,918130577

Tabla 4: Genes/EST sobreexpresados en los grupos control y periodontal. En rojo, valores superiores a 5.000 u.f.

...continuación...

Referencia Affymetrix	Símbolo del gen	Nombre del gen	Media de expresión CTR	Media de expresión PERIO	Media relativa PERIO/CTR
206165_s_at	CLCA2	chloride channel, calcium activated, family member 2	5650,0	5499,6	0,973389224
224329_s_at	CNFN	cornifelin	7449,0	7841,7	1,05271613
1556499_s_at	COL1A1	collagen, type I, alpha 1	3879,4	5526,7	1,424629992
220090_at	CRNN	cornulin	9824,5	9862,1	1,003823761
201160_s_at	CSDA	cold shock domain protein A	6158,8	4979,7	0,808560155
204971_at	CSTA	cystatin A (stefin A)	14017,3	12413,7	0,885596268
201201_at	CSTB	cystatin B (stefin B)	13353,4	11398,5	0,853601945
222484_s_at	CXCL14	chemokine (C-X-C motif) ligand 14	5182,5	2939,5	0,567197731
202428_x_at	DBI	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-Coenzyme A binding protein)	7602,7	6565,1	0,863528447
209389_x_at	DBI	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-Coenzyme A binding protein)	5089,3	4763,3	0,935944249
211070_x_at	DBI	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-Coenzyme A binding protein)	6102,0	5317,6	0,871446871
226817_at	DSC2	desmocollin 2	10503,7	9059,6	0,862516046
206642_at	DSG1	desmoglein 1	5015,2	3937,7	0,785147916
205595_at	DSG3	desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen)	6232,7	5393,9	0,865418401
235075_at	DSG3	desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen)	6951,0	6209,1	0,893268786
200606_at	DSP	desmoplakin	11099,9	9674,0	0,871540306
201022_s_at	DSTN	destrin (actin depolymerizing factor)	5549,0	5029,9	0,906451051
201041_s_at	DUSP1	dual specificity phosphatase 1	4411,6	6342,8	1,437757134
200703_at	DYNLL1 /// LOC731308	dynein, light chain, LC8-type 1 /// similar to dynein, cytoplasmic, light peptide	8937,5	8798,5	0,984449446
204892_x_at	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	12349,1	10978,9	0,889038097
206559_x_at	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	13972,0	11559,4	0,827323901
213477_x_at	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	12841,9	11473,4	0,893438251
213614_x_at	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	14040,4	12489,3	0,889531481
213583_x_at	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	11507,1	10388,7	0,902803627
200705_s_at	EEF1B2	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	7822,1	6470,3	0,827183353
200689_x_at	EEF1G	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	7750,8	6519,0	0,841082388
211345_x_at	EEF1G	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	7851,2	6490,1	0,826630211
211927_x_at	EEF1G	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	9432,9	7588,4	0,804460982
200094_s_at	EEF2	eukaryotic translation elongation factor 2	5139,4	3779,3	0,735343715

Continuación de la tabla 4.



...continuación...

Referencia Affymetrix	Símbolo del gen	Nombre del gen	Media de expresión CTR	Media de expresión PERIO	Media relativa PERIO/CTR
204102_s_at	EEF2	eukaryotic translation elongation factor 2	6896,4	5970,3	0,865721239
225645_at	EHF	Ets homologous factor	4940,9	5268,6	1,066323502
211956_s_at	EIF1	eukaryotic translation initiation factor 1	9664,6	8892,3	0,92008795
211787_s_at	EIF4A1	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1	5150,2	4526,4	0,878869566
200004_at	EIF4G2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2	6246,9	5722,1	0,915992551
201324_at	EMP1	epithelial membrane protein 1	7185,2	7559,2	1,052046921
202345_s_at	FABP5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	14579,2	12892,8	0,884326951
200019_s_at	FAU	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived); ribosomal protein S30	6584,0	5691,1	0,864390261
212581_x_at	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	9667,6	9146,4	0,946084516
213453_x_at	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	9513,1	8346,5	0,877369102
217398_x_at	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	9442,7	9006,2	0,95377357
201667_at	GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	7740,5	6138,9	0,793090455
223278_at	GJB2	gap junction protein, beta 2, 26kDa	10801,5	9888,9	0,915510452
231771_at	GJB6	gap junction protein, beta 6	6972,1	6497,9	0,931983831
226177_at	GLTP	glycolipid transfer protein	6155,9	5080,3	0,825272369
215001_s_at	GLUL	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)	4978,1	6173,2	1,240073925
200651_at	GNB2L1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	8238,4	7276,1	0,883189056
201348_at	GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)	5451,2	4849,8	0,88967533
208755_x_at	H3F3A	H3 histone, family 3A	10625,1	9490,0	0,893163358
211940_x_at	H3F3A /// LOC440926	H3 histone, family 3A /// H3 histone, family 3A pseudogene	9497,2	8387,4	0,883146056
213828_x_at	H3F3A /// LOC440926	H3 histone, family 3A /// H3 histone, family 3A pseudogene	10494,4	9297,4	0,885942344
200080_s_at	H3F3A	H3 histone, family 3A	8532,2	8078,4	0,94681489
209069_s_at	H3F3B	H3 histone, family 3B (H3.3B)	5571,2	5325,8	0,955948916
211997_x_at	H3F3B	H3 histone, family 3B (H3.3B)	7604,5	6939,3	0,91252967
211999_at	H3F3B	H3 histone, family 3B (H3.3B)	6939,8	5920,6	0,85313938
211745_x_at	HBA1	hemoglobin, alpha 1	4187,7	6813,5	1,627021305
204018_x_at	HBA1 /// HBA2	hemoglobin, alpha 1 /// hemoglobin, alpha 2	3358,8	5094,0	1,516593063
209458_x_at	HBA1 /// HBA2	hemoglobin, alpha 1 /// hemoglobin, alpha 2	3699,6	5474,4	1,479745376
214414_x_at	HBA2	hemoglobin, alpha 2	4939,3	7190,0	1,455670319
209116_x_at	HBB	hemoglobin, beta	3833,5	6068,3	1,582954728
211696_x_at	HBB	hemoglobin, beta	4823,4	7405,3	1,535288162
217232_x_at	HBB	hemoglobin, beta	3979,1	6138,3	1,542643646

Continuación de la tabla 4.

...continuación...

Referencia Affymetrix	Símbolo del gen	Nombre del gen	Media de expresión CTR	Media de expresión PERIO	Media relativa PERIO/CTR
213932_x_at	HLA-A	Major histocompatibility complex, class I, A	5649,7	5131,7	0,908321754
215313_x_at	HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A	5219,2	4683,7	0,897392337
208812_x_at	HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C	4088,0	5448,0	1,332681018
214459_x_at	HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C	3535,5	5187,0	1,46713085
216526_x_at	HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C	4807,4	5566,6	1,157942179
200016_x_at	HNRPA1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	7854,9	6802,4	0,866001125
213356_x_at	HNRPA1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	6922,3	6043,6	0,873063033
1555653_at	HNRPA3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	7264,7	4669,5	0,642760295
211597_s_at	HOP	homeodomain-only protein	8776,5	8230,4	0,937782597
200799_at	HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A	5052,1	4414,1	0,873724944
208687_x_at	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8	5588,5	5584,4	0,999260384
210338_s_at	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8	5578,0	5343,6	0,957980883
221891_x_at	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8	6649,7	6740,8	1,013692313
224187_x_at	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8	7238,5	7484,0	1,033915945
201841_s_at	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	10943,6	9619,1	0,878970726
207783_x_at	HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing 1	14782,4	12662,9	0,856619873
211430_s_at	IGH@ /// IGHG1 /// IGHG2 /// IGHG3 /// IGHM /// IGHV4-31	immunoglobulin heavy locus /// immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker) /// immunoglobulin heavy constant gamma 2 (G2m marker) /// immunoglobulin heavy constant gamma 3 (G3m marker) /// immunoglobulin heavy constant mu /// immunoglobulin heavy variable 4-31	5536,5	9353,1	1,689367736
217022_s_at	IGHA1 /// IGHA2	immunoglobulin heavy constant alpha 1 /// immunoglobulin heavy constant alpha 2 (A2m marker)	3894,8	5717,4	1,46798468
221651_x_at	IGKC /// IGKV1-5 /// IGKV2-24	immunoglobulin kappa constant /// immunoglobulin kappa variable 1-5 /// immunoglobulin kappa variable 2-24	5373,0	8447,8	1,57227673
221671_x_at	IGKC /// IGKV1-5 /// IGKV2-24	immunoglobulin kappa constant /// immunoglobulin kappa variable 1-5 /// immunoglobulin kappa variable 2-24	5165,7	8081,7	1,564482616
224795_x_at	IGKC /// IGKV1-5 /// IGKV2-24	immunoglobulin kappa constant /// immunoglobulin kappa variable 1-5 /// immunoglobulin kappa variable 2-24	5461,1	7774,5	1,423618635

Continuación de la tabla 4.

...continuación...

Referencia Affymetrix	Símbolo del gen	Nombre del gen	Media de expresión CTR	Media de expresión PERIO	Media relativa PERIO/CTR
209138_x_at	IGL@	Immunoglobulin lambda locus	5163,3	8951,1	1,733598236
215379_x_at	IGL@ /// IGLJ3 /// IGLV2-14 /// IGLV3-25	immunoglobulin lambda locus /// immunoglobulin lambda variable 3-25 /// immunoglobulin lambda variable 2-14 /// immunoglobulin lambda joining 3	3465,1	6542,2	1,888022048
214677_x_at	IGL@ /// IGLJ3 /// IGLV2-14 /// IGLV3-25 /// IGLV4-3	immunoglobulin lambda locus /// immunoglobulin lambda variable 4-3 /// immunoglobulin lambda variable 3-25 /// immunoglobulin lambda variable 2-14 /// immunoglobulin lambda joining 3	4682,9	7030,4	1,501291934
215121_x_at	IGL@ /// IGLV2-14 /// IGLV3-25 /// IGLV4-3	immunoglobulin lambda locus /// immunoglobulin lambda variable 4-3 /// immunoglobulin lambda variable 3-25 /// immunoglobulin lambda variable 2-14	5641,7	10227,6	1,812844161
212657_s_at	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	6470,9	6834,2	1,056138218
217731_s_at	ITM2B	integral membrane protein 2B	9999,1	9394,3	0,939517588
217732_s_at	ITM2B	integral membrane protein 2B	9803,8	9189,2	0,937306729
214599_at	IVL	involucrin	6783,0	5242,1	0,772824776
201015_s_at	JUP	junction plakoglobin	5107,0	4593,8	0,89950982
211058_x_at	K-ALPHA-1	tubulin, alpha, ubiquitous	7964,9	6743,2	0,846606793
211072_x_at	K-ALPHA-1	alpha tubulin	7586,2	6047,9	0,797224798
213646_x_at	K-ALPHA-1	alpha tubulin	7220,2	6239,0	0,864109785
221841_s_at	KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)	6129,7	5944,7	0,969827071
209792_s_at	KLK10	kallikrein 10	6264,6	5050,2	0,80615261
205900_at	KRT1	keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	10358,7	5589,5	0,539595732
207023_x_at	KRT10	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	8878,4	5949,4	0,670095719
210633_x_at	KRT10	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	9870,7	6271,2	0,635331503
213287_s_at	KRT10	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	9773,0	6389,4	0,653778529
207935_s_at	KRT13	keratin 13	14746,2	12894,4	0,874421459
209351_at	KRT14	keratin 14 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara, Koebner)	14389,8	12834,6	0,891927703
209800_at	KRT16	keratin 16 (focal non-epidermolytic palmoplantar keratoderma)	13945,9	11383,3	0,8162488
205157_s_at	KRT17	keratin 17	7282,1	6352,6	0,872355375
212236_x_at	KRT17	keratin 17	9580,1	8999,6	0,939412391
213240_s_at	KRT4	keratin 4	5783,7	6284,4	1,086567749
201820_at	KRT5	keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)	11628,4	10315,7	0,887113534

Continuación de la tabla 4.

...continuación...

Referencia Affymetrix	Símbolo del gen	Nombre del gen	Media de expresión CTR	Media de expresión PERIO	Media relativa PERIO/CTR
214580_x_at	KRT6A /// KRT6B /// KRT6C	keratin 6A /// keratin 6B /// keratin 6C	9182,2	9403,4	1,024097479
209125_at	KRT6A /// KRT6C /// KRT6E	keratin 6A /// keratin 6C /// keratin 6E	20258,0	17853,1	0,881288581
209126_x_at	KRT6B	keratin 6B	14172,4	12337,9	0,870562668
213680_at	KRT6B	keratin 6B	14117,1	11945,2	0,846146763
207878_at	KRT76	keratin 76	10571,5	7655,5	0,724158589
230835_at	KRTDAP	keratinocyte differentiation- associated protein	13111,4	9704,9	0,740188589
201553_s_at	LAMP1	lysosomal-associated membrane protein 1	5810,5	5221,5	0,898634946
224328_s_at	LCE3D	late cornified envelope 3D	6203,3	3942,3	0,635511206
200650_s_at	LDHA	lactate dehydrogenase A	7584,8	6449,8	0,850361138
208949_s_at	LGALS3 /// GALIG	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3) /// galectin-3 internal gene	5286,5	4271,9	0,808068325
206400_at	LGALS7	lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7)	8994,6	5472,7	0,608449932
1553551_s_at	LOC643788	similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2 (NADH dehydrogenase subunit 2)	11845,8	10460,9	0,883089036
221798_x_at	LOC644808	similar to 40S ribosomal protein S2	13494,0	11463,9	0,849556779
200638_s_at	LOC650083 /// YWHAZ	tyrosine 3- monooxygenase/tryptophan 5- monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	5578,1	4710,8	0,844507987
200639_s_at	LOC650083 /// YWHAZ	tyrosine 3- monooxygenase/tryptophan 5- monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	6107,5	5312,7	0,869872752
200640_at	LOC650083 /// YWHAZ	tyrosine 3- monooxygenase/tryptophan 5- monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	6273,4	5827,7	0,928950962
206276_at	LY6D	lymphocyte antigen 6 complex, locus D	8243,7	6830,1	0,828521925
204952_at	LYPD3	LY6/PLAUR domain containing 3	6482,3	6244,8	0,963364152
204777_s_at	MAL	mal, T-cell differentiation protein	7304,8	7083,4	0,969700081
221474_at	MRLC2	myosin regulatory light chain MRLC2	5374,5	5152,7	0,9587282
212082_s_at	MYL6	myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	7431,4	7121,5	0,958305019
200735_x_at	NACA	nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide	9200,9	7907,3	0,859411795
208635_x_at	NACA	nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide	9510,3	8125,0	0,854338629
201146_at	NFE2L2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	5041,4	4447,9	0,882283904

Continuación de la tabla 4.

...continuación...

Referencia Affymetrix	Símbolo del gen	Nombre del gen	Media de expresión CTR	Media de expresión PERIO	Media relativa PERIO/CTR
200063_s_at	NPM1	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	6712,5	6262,1	0,932899154
200077_s_at	OAZ1	ornithine decarboxylase antizyme 1	5950,1	5863,5	0,985456705
215952_s_at	OAZ1	ornithine decarboxylase antizyme 1	4941,8	5174,8	1,047141908
200654_at	P4HB	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide	5312,6	4747,5	0,893626433
215157_x_at	PABPC1	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	8304,6	7195,4	0,866431724
208113_x_at	PABPC3	poly(A) binding protein, cytoplasmic 3	5933,3	5298,5	0,893013143
215823_x_at	PABPC3 /// PABPC1 /// LOC652607	poly(A) binding protein, cytoplasmic 3 /// poly(A) binding protein, cytoplasmic 1 /// similar to Polyadenylate-binding protein 1 (Poly(A)-binding protein 1) (PABP 1)	4977,3	5011,5	1,00686115
217744_s_at	PERP	PERP, TP53 apoptosis effector	8879,3	8412,7	0,947456345
222392_x_at	PERP	PERP, TP53 apoptosis effector	12882,9	11393,7	0,884403765
200886_s_at	PGAM1	phosphoglycerate mutase 1 (brain)	5039,9	4749,6	0,942402386
41469_at	PI3	peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	5293,4	4367,2	0,825012752
201215_at	PLS3	plastin 3 (T isoform)	5058,1	4770,1	0,943061436
201293_x_at	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	10270,9	9211,0	0,896806993
211378_x_at	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	10050,7	8900,4	0,885554855
211765_x_at	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	10233,2	9391,8	0,917783677
211978_x_at	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	10300,1	9433,6	0,915875813
212661_x_at	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	10522,4	9624,6	0,914678709
228222_at	PPP1CB	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	5609,5	5084,0	0,906322329
208680_at	PRDX1	peroxiredoxin 1	5385,3	5626,6	1,044807576
211921_x_at	PTMA	prothymosin, alpha (gene sequence 28)	5212,7	4222,4	0,810020463
208724_s_at	RAB1A	RAB1A, member RAS oncogene family	5428,1	5321,9	0,980429062
219554_at	RHCG	Rh family, C glycoprotein	4716,9	5338,1	1,131701595
200059_s_at	RHOA	ras homolog gene family, member A	5036,2	5053,3	1,003382157
200725_x_at	RPL10	ribosomal protein L10	7232,3	6143,6	0,849465017
200036_s_at	RPL10A	ribosomal protein L10a	6592,3	5498,8	0,834129717
229563_s_at	RPL10A	ribosomal protein L10a	12488,5	11100,5	0,888856266
200010_at	RPL11	Ribosomal protein L11	8824,9	7535,6	0,853901475

Continuación de la tabla 4.

...continuación...

Referencia Affymetrix	Símbolo del gen	Nombre del gen	Media de expresión CTR	Media de expresión PERIO	Media relativa PERIO/CTR
200088_x_at	RPL12	ribosomal protein L12	9721,9	8481,7	0,872425924
200809_x_at	RPL12	ribosomal protein L12	8198,0	6984,9	0,852020818
214271_x_at	RPL12	ribosomal protein L12	7419,5	6338,4	0,854289045
208929_x_at	RPL13	ribosomal protein L13	8963,1	7160,6	0,798904393
212191_x_at	RPL13	ribosomal protein L13	8557,5	6776,1	0,79183408
212734_x_at	RPL13	ribosomal protein L13	9941,4	8206,9	0,825528683
212933_x_at	RPL13	ribosomal protein L13	7765,0	6471,3	0,833394506
214351_x_at	RPL13	ribosomal protein L13	9876,5	7963,1	0,806274859
200715_x_at	RPL13A	ribosomal protein L13a	5690,2	5313,9	0,933868563
200716_x_at	RPL13A	ribosomal protein L13a	11524,9	9866,2	0,856080973
210646_x_at	RPL13A	ribosomal protein L13a	13051,0	11028,8	0,845050583
212790_x_at	RPL13A	ribosomal protein L13a	12384,3	10272,9	0,829507023
211942_x_at	RPL13A	ribosomal protein L13a	8890,0	7733,4	0,869902268
213588_x_at	RPL14	ribosomal protein L14	5485,6	4609,5	0,840299573
221475_s_at	RPL15	ribosomal protein L15	6876,1	6058,8	0,881145425
200038_s_at	RPL17	ribosomal protein L17	10646,8	9204,5	0,86452737
212270_x_at	RPL17	ribosomal protein L17	8825,9	7241,3	0,82045491
212537_x_at	RPL17	ribosomal protein L17	8992,2	7294,8	0,811232698
200022_at	RPL18	ribosomal protein L18	9976,6	8635,2	0,865543481
200869_at	RPL18A /// LOC390354	ribosomal protein L18a /// similar to ribosomal protein L18a; 60S ribosomal protein L18a	11815,4	9796,4	0,829117084
200029_at	RPL19	ribosomal protein L19	7915,0	7144,0	0,902586013
200012_x_at	RPL21	ribosomal protein L21	8997,2	7346,7	0,816555552
208768_x_at	RPL22	ribosomal protein L22	7739,3	6891,1	0,890402817
220960_x_at	RPL22	ribosomal protein L22	7679,1	6958,1	0,906104652
221775_x_at	RPL22	ribosomal protein L22	7868,4	7123,1	0,90527551
200888_s_at	RPL23	ribosomal protein L23	5229,4	4939,3	0,94451881
203012_x_at	RPL23A	ribosomal protein L23a	10348,6	9083,6	0,877756411
208825_x_at	RPL23A	ribosomal protein L23a	13504,4	11643,5	0,862200468
208834_x_at	RPL23A	ribosomal protein L23a	13484,5	11722,6	0,86933425
213084_x_at	RPL23A	ribosomal protein L23a	13106,4	11439,0	0,872780982
200013_at	RPL24	ribosomal protein L24	7780,3	6868,3	0,882778727
214143_x_at	RPL24 /// SLC36A2	ribosomal protein L24 /// solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 2	8548,9	7588,5	0,88766196
200025_s_at	RPL27	ribosomal protein L27	9720,8	8259,4	0,849662579
203034_s_at	RPL27A /// LOC389435	ribosomal protein L27a /// similar to 60S ribosomal protein L27a	13737,7	11899,9	0,866226676
200003_s_at	RPL28	ribosomal protein L28	11712,9	10858,3	0,927038926
200823_x_at	RPL29	ribosomal protein L29	7315,5	5635,3	0,770319253
213969_x_at	RPL29	ribosomal protein L29	8535,7	7030,8	0,823685963
201217_x_at	RPL3	ribosomal protein L3	13035,2	10727,8	0,822985258
211073_x_at	RPL3	ribosomal protein L3	10800,0	9264,4	0,857807538
211666_x_at	RPL3	ribosomal protein L3	6754,9	6027,6	0,89233248

Continuación de la tabla 4.

...continuación...

Referencia Affymetrix	Símbolo del gen	Nombre del gen	Media de expresión CTR	Media de expresión PERIO	Media relativa PERIO/CTR
212039_x_at	RPL3	ribosomal protein L3	10948,7	9495,0	0,867222999
215963_x_at	RPL3 /// LOC653881	ribosomal protein L3 /// similar to 60S ribosomal protein L3 (L4)	9674,1	7679,9	0,793865407
200062_s_at	RPL30	ribosomal protein L30	10763,8	9014,1	0,837446135
200963_x_at	RPL31	ribosomal protein L31	11992,0	10322,0	0,860736324
200674_s_at	RPL32	ribosomal protein L32	8682,2	7125,8	0,820738943
200026_at	RPL34	ribosomal protein L34	9520,6	8288,6	0,870598368
200002_at	RPL35	ribosomal protein L35	7729,4	6709,7	0,868075426
213687_s_at	RPL35A	ribosomal protein L35a	5767,9	5208,1	0,902944771
225190_x_at	RPL35A	ribosomal protein L35a	6203,7	5538,6	0,892792473
201406_at	RPL36A	ribosomal protein L36a	10633,0	9170,4	0,86245137
200092_s_at	RPL37	ribosomal protein L37	11223,4	9681,7	0,862635005
201429_s_at	RPL37A	ribosomal protein L37a	14394,2	12652,4	0,878988576
202029_x_at	RPL38	ribosomal protein L38	7309,8	6608,3	0,904041625
208695_s_at	RPL39	ribosomal protein L39	13917,3	12034,2	0,864690152
200089_s_at	RPL4	ribosomal protein L4	7238,0	6608,0	0,912963986
201154_x_at	RPL4	ribosomal protein L4	7661,0	6420,7	0,838093726
211710_x_at	RPL4	ribosomal protein L4	7726,0	6387,3	0,826727558
201492_s_at	RPL41	ribosomal protein L41	13900,5	11838,9	0,851684348
200937_s_at	RPL5	ribosomal protein L5	5996,2	5648,7	0,942052189
213080_x_at	RPL5	ribosomal protein L5	10433,9	9219,1	0,883571261
200034_s_at	RPL6	ribosomal protein L6	9552,2	8710,0	0,911829777
200717_x_at	RPL7	ribosomal protein L7	13771,3	11890,6	0,863429907
212042_x_at	RPL7	ribosomal protein L7	11015,3	10213,2	0,927180184
217740_x_at	RPL7A	ribosomal protein L7a	12326,8	10429,8	0,846108084
224930_x_at	RPL7A	ribosomal protein L7a	10600,8	8795,1	0,829664836
234873_x_at	RPL7A	ribosomal protein L7a	9572,1	7899,3	0,825244984
200936_at	RPL8	ribosomal protein L8	8580,4	7381,2	0,860238801
200032_s_at	RPL9	ribosomal protein L9	12335,4	10252,0	0,831102626
201033_x_at	RPLP0	ribosomal protein, large, P0	10930,9	9235,7	0,844913418
208856_x_at	RPLP0	ribosomal protein, large, P0	11077,9	9422,0	0,850516418
211720_x_at	RPLP0	ribosomal protein, large, P0	11653,7	9715,0	0,833644633
211972_x_at	RPLP0	ribosomal protein, large, P0	10297,4	8706,0	0,845458621
214167_s_at	RPLP0 /// RPLP0-like	ribosomal protein, large, P0 /// similar to ribosomal protein P0	8617,7	7444,9	0,863902464
200763_s_at	RPLP1	ribosomal protein, large, P1	12293,3	10652,8	0,866557212
200909_s_at	RPLP2	ribosomal protein, large, P2	9274,7	8186,1	0,88263169
200095_x_at	RPS10	ribosomal protein S10	11975,1	10012,2	0,836091151
200817_x_at	RPS10	ribosomal protein S10	12724,1	10590,7	0,832329117
211542_x_at	RPS10	ribosomal protein S10	12912,3	10953,6	0,848306333
200031_s_at	RPS11	ribosomal protein S11	11798,5	10051,4	0,851919238
213377_x_at	RPS12	ribosomal protein S12	11356,1	9779,9	0,861201942
200018_at	RPS13	ribosomal protein S13	11786,8	10512,4	0,891878745
208645_s_at	RPS14	ribosomal protein S14	12285,2	10752,3	0,875224865

Continuación de la tabla 4.

...continuación...

Referencia Affymetrix	Símbolo del gen	Nombre del gen	Media de expresión CTR	Media de expresión PERIO	Media relativa PERIO/CTR
208646_at	RPS14	ribosomal protein S14	5601,1	4785,8	0,854442715
200819_s_at	RPS15	ribosomal protein S15	8752,9	7926,4	0,90556862
200781_s_at	RPS15A	ribosomal protein S15a	9784,2	8396,9	0,858210176
201258_at	RPS16	ribosomal protein S16	7354,1	6780,4	0,921987182
213890_x_at	RPS16	ribosomal protein S16	8865,4	7428,9	0,8379703
226131_s_at	RPS16	ribosomal protein S16	13692,1	12088,0	0,88284256
201665_x_at	RPS17	ribosomal protein S17	9567,0	8066,3	0,843131448
211487_x_at	RPS17	ribosomal protein S17	9628,0	7998,9	0,830792427
212578_x_at	RPS17	ribosomal protein S17	8059,1	6674,4	0,828183875
201049_s_at	RPS18	ribosomal protein S18	12527,1	10369,5	0,827762973
202649_x_at	RPS19	ribosomal protein S19	10808,4	8884,9	0,82203348
213414_s_at	RPS19	ribosomal protein S19	13316,0	10954,0	0,822621908
203107_x_at	RPS2	ribosomal protein S2	12012,1	10327,7	0,859768179
212433_x_at	RPS2	ribosomal protein S2	11323,4	9622,3	0,84977024
217466_x_at	RPS2	ribosomal protein S2	4608,3	5260,7	1,14157839
200949_x_at	RPS20	ribosomal protein S20	8001,5	6773,2	0,84648856
214003_x_at	RPS20	ribosomal protein S20	13448,9	11481,0	0,853676128
200834_s_at	RPS21	ribosomal protein S21	11186,1	9257,2	0,827563293
200926_at	RPS23	ribosomal protein S23	12256,6	11106,3	0,906148524
200061_s_at	RPS24	ribosomal protein S24	10794,7	9148,0	0,847448756
200091_s_at	RPS25	ribosomal protein S25	7223,3	6583,6	0,911428242
217753_s_at	RPS26	ribosomal protein S26	6678,3	5443,3	0,815069741
200741_s_at	RPS27	ribosomal protein S27 (metallopanstimulin 1)	12906,7	11214,4	0,868883345
200017_at	RPS27A	ribosomal protein S27a	11632,3	10327,9	0,887862693
208904_s_at	RPS28	ribosomal protein S28	8385,5	7562,4	0,901842076
201094_at	RPS29	ribosomal protein S29	11608,2	10136,1	0,873188598
208692_at	RPS3	ribosomal protein S3	9193,5	8057,2	0,876397956
201257_x_at	RPS3A	ribosomal protein S3A	14319,2	11611,7	0,810913772
212391_x_at	RPS3A	ribosomal protein S3A	14707,0	12001,1	0,816015766
200099_s_at	RPS3A	ribosomal protein S3A	12944,4	11116,0	0,858745867
200933_x_at	RPS4X	ribosomal protein S4, X-linked	11958,9	10347,5	0,865252566
213347_x_at	RPS4X	ribosomal protein S4, X-linked	10746,2	9542,1	0,887947814
200024_at	RPS5	ribosomal protein S5	7964,6	6219,2	0,78085947
200081_s_at	RPS6	ribosomal protein S6	8129,9	6730,4	0,827850167
201254_x_at	RPS6	ribosomal protein S6	11200,5	9459,6	0,844571158
209134_s_at	RPS6	ribosomal protein S6	10102,4	8740,2	0,865159104
200082_s_at	RPS7	ribosomal protein S7 /// ribosomal protein S7	8235,4	6804,5	0,826250443
213941_x_at	RPS7	ribosomal protein S7	8665,9	7552,2	0,871484044
200858_s_at	RPS8	ribosomal protein S8	7211,9	6712,6	0,930769675
217747_s_at	RPS9	ribosomal protein S9	6440,2	5390,4	0,836987886
213801_x_at	RPSA	ribosomal protein SA	10181,5	8469,2	0,831824871

Continuación de la tabla 4.



...continuación...

Referencia Affymetrix	Símbolo del gen	Nombre del gen	Media de expresión CTR	Media de expresión PERIO	Media relativa PERIO/CTR
200872_at	S100A10	S100 calcium binding protein A10 (annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11))	7253,4	7280,3	1,003708606
200660_at	S100A11	S100 calcium binding protein A11 (calgizzarin)	8276,8	7870,0	0,950856314
208540_x_at	S100A11	S100 calcium binding protein A11 (calgizzarin)	5450,1	5305,6	0,97348069
227998_at	S100A16	S100 calcium binding protein A16	7510,3	6809,3	0,906661932
204268_at	S100A2	S100 calcium binding protein A2	13700,3	12231,7	0,892800531
217728_at	S100A6	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	6515,2	7661,9	1,17599914
205916_at	S100A7	S100 calcium binding protein A7 (psoriasis 1)	10400,1	10667,5	1,025714538
202917_s_at	S100A8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	18331,2	15883,2	0,866457976
203535_at	S100A9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	14978,3	13012,1	0,868728017
235272_at	SBSN	suprabasin	9809,0	8450,6	0,861509838
209719_x_at	SERPINB3	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	5369,0	4565,3	0,850307784
204855_at	SERPINB5	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	5984,5	5064,3	0,846244037
209260_at	SFN	stratifin	6617,0	5632,0	0,851147807
33322_i_at	SFN	stratifin	13502,5	11884,3	0,88015444
33323_r_at	SFN	stratifin	14692,2	12805,8	0,871605487
200718_s_at	SKP1A	S-phase kinase-associated protein 1A (p19A)	6007,6	5265,5	0,876478683
203021_at	SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibitor	7530,7	6576,0	0,873231955
205185_at	SPINK5	serine peptidase inhibitor, Kazal type 5	5848,3	5218,0	0,892233333
223720_at	SPINK7	serine peptidase inhibitor, Kazal type 7 (putative)	6917,7	6370,9	0,920954168
213796_at	SPRR1A	small proline-rich protein 1A	15014,6	13898,2	0,925645787
214549_x_at	SPRR1A	small proline-rich protein 1A	13591,2	13302,9	0,978788893
205064_at	SPRR1B	small proline-rich protein 1B (cornifin)	13162,2	12045,8	0,91518146
208539_x_at	SPRR2B	small proline-rich protein 2B	15552,8	15094,1	0,970510038
236119_s_at	SPRR2G	small proline-rich protein 2G	5383,4	4095,9	0,76083726
218990_s_at	SPRR3	small proline-rich protein 3	16860,1	15070,8	0,893876458
232082_x_at	SPRR3	small proline-rich protein 3	15569,0	13909,0	0,893372742
213881_x_at	SUMO2	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2 (S. cerevisiae)	5485,0	5259,9	0,958948773
202286_s_at	TACSTD2	tumor-associated calcium signal transducer 2	10358,7	10324,6	0,996708071
206004_at	TGM3	transglutaminase 3 (E polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	5651,6	5240,7	0,927300823
217733_s_at	TMSB10	thymosin, beta 10	7781,2	7431,4	0,955039165

Continuación de la tabla 4.

...continuación.

Referencia Affymetrix	Símbolo del gen	Nombre del gen	Media de expresión CTR	Media de expresión PERIO	Media relativa PERIO/CTR
216438_s_at	TMSB4X /// TMSL3	thymosin, beta 4, X-linked /// thymosin-like 3	8244,0	8479,4	1,02856028
211943_x_at	TPT1	tumor protein, translationally-controlled 1	11866,4	10425,4	0,878561878
212284_x_at	TPT1	tumor protein, translationally-controlled 1	15195,7	13379,8	0,880504179
212869_x_at	TPT1	tumor protein, translationally-controlled 1	15044,9	12731,9	0,846265223
214327_x_at	TPT1	tumor protein, translationally-controlled 1	10328,8	9416,1	0,91163984
216520_s_at	TPT1	tumor protein, translationally-controlled 1	13715,2	12135,5	0,884824726
202504_at	TRIM29	tripartite motif-containing 29	8471,3	7327,2	0,864945955
201090_x_at	TUBA1B	tubulin, alpha 1b	6993,0	5816,6	0,831777015
212639_x_at	TUBA1B	tubulin, alpha 1b	9035,4	7690,9	0,851197426
211750_x_at	TUBA1C	tubulin, alpha 1c	7105,1	6019,7	0,8472448
209251_x_at	TUBA6	tubulin, alpha 6	7431,8	6560,8	0,882807402
204141_at	TUBB2A	tubulin, beta 2A	7148,4	5532,8	0,773990329
208864_s_at	TXN	thioredoxin	9817,3	8533,0	0,869187739
221700_s_at	UBA52	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	5875,5	4817,3	0,819893342
200633_at	UBB	ubiquitin B /// ubiquitin B	9007,7	8612,3	0,95610776
208980_s_at	UBC	ubiquitin C	8729,3	8748,4	1,002193774
211296_x_at	UBC	ubiquitin C	11630,6	10341,9	0,889196188
212426_s_at	YWHAQ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	5261,7	4586,3	0,871629754
213699_s_at	YWHAQ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	5573,7	4808,1	0,862643195
1553538_s_at	---	---	14003,9	12030,3	0,859073279
1553569_at	---	---	15800,2	13378,8	0,846749099
1553570_x_at	---	---	16000,7	13973,1	0,873277683
1553588_at	---	---	15252,4	13831,7	0,906852911
216342_x_at	---	---	6208,4	5574,6	0,897905
224372_at	---	---	15010,7	12858,5	0,856618945
224373_s_at	---	---	14897,1	13396,5	0,899265629

Continuación de la tabla 4.

## RESULTADOS

GO-ID	Funciones de los genes del test	Funciones agrupadas	Valor p en control	Valor p corregido en control	Valor p en perio	Valor p corregido en perio
3740	structural constituent of ribosome	CONSTITUYENTE CELULAR	9,40E-81	3,05E-78	4,82E-85	2,20E-82
5200	structural constituent of cytoskeleton	CONSTITUYENTE CELULAR	2,09E-05	4,62E-04	1,00E-05	2,04E-04
5575	cellular_component	CONSTITUYENTE CELULAR	8,21E+00	1,02E+02	1,43E+00	1,89E+01
5622	intracellular	CONSTITUYENTE CELULAR	2,00E-11	5,55E-10	1,11E-11	2,91E-10
5623	cell	CONSTITUYENTE CELULAR	5,74E-01	8,23E+00	6,65E-03	1,01E-01
5737	cytoplasm	CONSTITUYENTE CELULAR	6,71E-25	2,72E-23	1,26E-27	5,02E-26
5829	cytosol	CONSTITUYENTE CELULAR	2,82E-41	1,83E-39	6,60E-43	3,77E-41
5830	cytosolic ribosome (sensu Eukaryota)	CONSTITUYENTE CELULAR	1,11E-85	1,08E-82	1,92E-84	5,85E-82
5840	ribosome	CONSTITUYENTE CELULAR	1,08E-78	2,63E-76	6,00E-83	1,37E-80
5842	cytosolic large ribosomal subunit (sensu Eukaryota)	CONSTITUYENTE CELULAR	2,34E-31	1,20E-29	2,03E-29	9,74E-28
5843	cytosolic small ribosomal subunit (sensu Eukaryota)	CONSTITUYENTE CELULAR	1,34E-49	1,09E-47	1,95E-50	1,49E-48
5856	cytoskeleton	CONSTITUYENTE CELULAR	7,86E-09	1,96E-07	2,74E-07	6,11E-06
5882	intermediate filament	CONSTITUYENTE CELULAR	1,19E-03	2,18E-02	5,63E-04	9,88E-03
15934	large ribosomal subunit	CONSTITUYENTE CELULAR	7,95E-27	3,69E-25	1,19E-25	4,52E-24
15935	small ribosomal subunit	CONSTITUYENTE CELULAR	2,21E-36	1,27E-34	4,75E-43	2,89E-41
30529	ribonucleoprotein complex	CONSTITUYENTE CELULAR	9,81E-65	1,36E-62	1,93E-67	2,52E-65
43226	organelle	CONSTITUYENTE CELULAR	3,59E-13	1,03E-11	7,17E-12	1,92E-10
43228	non-membrane-bound organelle	CONSTITUYENTE CELULAR	2,32E-67	3,77E-65	1,98E-68	3,01E-66
43229	intracellular organelle	CONSTITUYENTE CELULAR	3,53E-13	1,03E-11	7,05E-12	1,92E-10
43232	intracellular non-membrane-bound organelle	CONSTITUYENTE CELULAR	2,32E-67	3,77E-65	1,98E-68	3,01E-66
44422	organelle part	CONSTITUYENTE CELULAR	1,57E-17	5,27E-16	7,06E-21	2,39E-19
44424	intracellular part	CONSTITUYENTE CELULAR	9,69E-14	3,04E-12	7,77E-14	2,29E-12
44430	cytoskeletal part	CONSTITUYENTE CELULAR	6,63E-03	1,11E-01	2,11E-03	3,51E-02
44444	cytoplasmic part	CONSTITUYENTE CELULAR	4,43E-22	1,73E-20	2,18E-25	7,96E-24
44445	cytosolic part	CONSTITUYENTE CELULAR	4,24E-63	4,59E-61	1,53E-66	1,55E-64
44446	intracellular organelle part	CONSTITUYENTE CELULAR	1,57E-17	5,27E-16	7,06E-21	2,39E-19
44464	cell part	CONSTITUYENTE CELULAR	5,69E-01	8,23E+00	6,58E-03	1,01E-01
45111	intermediate filament cytoskeleton	CONSTITUYENTE CELULAR	1,19E-03	2,18E-02	5,63E-04	9,88E-03
3674	molecular_function	METABOLISMO CELULAR	1,30E-01	2,04E+00	1,84E-02	2,62E-01
3676	nucleic acid binding	METABOLISMO CELULAR	3,63E+01	3,53E+02	AUSENTE	AUSENTE
3723	RNA binding	METABOLISMO CELULAR	1,22E-18	4,38E-17	3,30E-17	1,04E-15
4857	enzyme inhibitor activity	METABOLISMO CELULAR	8,82E-01	1,21E+01	2,62E+01	2,78E+02
4859	phospholipase inhibitor activity	METABOLISMO CELULAR	AUSENTE	AUSENTE	5,23E+01	4,98E+02
4866	endopeptidase inhibitor activity	METABOLISMO CELULAR	1,47E+01	1,65E+02	AUSENTE	AUSENTE
4867	serine-type endopeptidase inhibitor activity	METABOLISMO CELULAR	2,31E+01	2,47E+02	AUSENTE	AUSENTE
5198	structural molecule activity	METABOLISMO CELULAR	3,94E-82	1,92E-79	3,98E-86	3,63E-83
5544	calcium-dependent phospholipid binding	METABOLISMO CELULAR	1,94E-01	2,91E+00	1,45E-01	1,98E+00
5885	Arp2/3 protein complex	METABOLISMO CELULAR	3,22E+01	3,16E+02	2,86E+01	3,00E+02

Tabla 5: Funciones génicas agrupadas de los genes expresados más de 5.000 u.f. en los grupos control y periodontal. En rojo, funciones sólo presentes en el grupo control. En amarillo, funciones sólo presentes en el grupo periodontal.

...continuación...

GO-ID	Funciones de los genes del test	Funciones agrupadas	Valor p en control	Valor p corregido en control	Valor p en perio	Valor p corregido en perio
6455	translational elongation	METABOLISMO CELULAR	1,82E-03	3,21E-02	1,21E-03	2,04E-02
7582	physiological process	METABOLISMO CELULAR	3,01E-03	5,24E-02	2,93E-05	5,69E-04
8135	translation factor activity, nucleic acid binding	METABOLISMO CELULAR	1,37E+00	1,85E+01	5,63E+00	6,86E+01
8143	poly(A) binding	METABOLISMO CELULAR	2,16E+01	2,34E+02	1,92E+01	2,14E+02
8150	biological_process	METABOLISMO CELULAR	8,30E-01	1,16E+01	4,63E-02	6,50E-01
8151	cellular physiological process	METABOLISMO CELULAR	1,25E-02	2,03E-01	7,56E-04	1,30E-02
8152	metabolism	METABOLISMO CELULAR	5,71E-03	9,76E-02	3,50E-03	5,52E-02
8182	translation elongation factor activity	METABOLISMO CELULAR	3,46E+00	4,62E+01	2,75E+00	3,54E+01
8426	protein kinase C inhibitor activity	METABOLISMO CELULAR	1,31E+01	1,50E+02	AUSENTE	AUSENTE
9059	macromolecule biosynthesis	METABOLISMO CELULAR	3,09E-60	3,01E-58	2,84E-63	2,59E-61
9987	cellular process	METABOLISMO CELULAR	AUSENTE	AUSENTE	4,31E+01	4,37E+02
18149	peptide cross-linking	METABOLISMO CELULAR	2,64E-05	5,71E-04	1,73E-05	3,44E-04
19538	protein metabolism	METABOLISMO CELULAR	1,27E-27	6,21E-26	6,03E-29	2,75E-27
19843	rRNA binding	METABOLISMO CELULAR	1,14E-06	2,79E-05	7,50E-07	1,63E-05
30414	protease inhibitor activity	METABOLISMO CELULAR	1,54E+01	1,70E+02	AUSENTE	AUSENTE
30674	protein binding, bridging	METABOLISMO CELULAR	7,23E+00	9,14E+01	5,27E+00	6,51E+01
42303	molting cycle	METABOLISMO CELULAR	1,31E+01	1,50E+02	1,16E+01	1,31E+02
43037	translation	METABOLISMO CELULAR	6,70E-03	1,11E-01	3,24E-03	5,18E-02
43170	macromolecule metabolism	METABOLISMO CELULAR	2,79E-19	1,05E-17	1,04E-19	3,40E-18
43234	protein complex	METABOLISMO CELULAR	1,29E-35	6,98E-34	2,53E-41	1,36E-39
44237	cellular metabolism	METABOLISMO CELULAR	5,52E-04	1,08E-02	4,20E-04	7,67E-03
44238	primary metabolism	METABOLISMO CELULAR	5,59E-05	1,16E-03	9,88E-05	1,84E-03
44260	cellular macromolecule metabolism	METABOLISMO CELULAR	5,09E-26	2,15E-24	1,58E-28	6,85E-27
44267	cellular protein metabolism	METABOLISMO CELULAR	4,97E-26	2,15E-24	1,66E-28	6,90E-27
45182	translation regulator activity	METABOLISMO CELULAR	5,37E-01	7,92E+00	2,10E+00	2,74E+01
3823	antigen binding	SISTEMA INMUNE	1,32E-01	2,04E+00	7,05E-03	1,06E-01
19882	antigen presentation	SISTEMA INMUNE	1,37E-02	2,18E-01	5,64E-05	1,07E-03
19883	antigen presentation, endogenous antigen	SISTEMA INMUNE	9,14E-06	2,17E-04	5,03E-09	1,18E-07
19885	antigen processing, endogenous antigen via MHC class I	SISTEMA INMUNE	1,23E-05	2,84E-04	7,34E-09	1,68E-07
30106	MHC class I receptor activity	SISTEMA INMUNE	6,81E-04	1,30E-02	1,24E-06	2,63E-05
30333	antigen processing	SISTEMA INMUNE	1,33E-03	2,40E-02	2,91E-06	6,04E-05
1533	cornified envelope	DIFERENCIACIÓN	8,28E-11	2,24E-09	4,12E-09	1,00E-07
1943	hair follicle development	DIFERENCIACIÓN	6,62E+00	8,49E+01	5,88E+00	7,06E+01
7275	development	DIFERENCIACIÓN	3,93E+01	3,79E+02	AUSENTE	AUSENTE
7398	ectoderm development	DIFERENCIACIÓN	6,41E-15	2,08E-13	3,29E-14	1,00E-12
7516	hemocyte development (sensu Arthropoda)	DIFERENCIACIÓN	4,46E+01	4,21E+02	3,96E+01	4,06E+02
8544	epidermis development	DIFERENCIACIÓN	3,27E-13	9,94E-12	1,86E-12	5,30E-11
9888	tissue development	DIFERENCIACIÓN	1,48E-09	3,80E-08	3,75E-09	9,50E-08
9913	epidermal cell differentiation	DIFERENCIACIÓN	4,64E-05	9,83E-04	1,05E-02	1,55E-01

Continuación de la tabla 5.

...continuación.

GO-ID	Funciones de los genes del test	Funciones agrupadas	Valor p en control	Valor p corregido en control	Valor p en perío	Valor p corregido en perío
30154	cell differentiation	DIFERENCIACIÓN	6,64E-01	9,38E+00	6,74E+00	7,99E+01
30216	keratinocyte differentiation	DIFERENCIACIÓN	1,41E-10	3,71E-09	4,18E-09	1,00E-07
30280	structural constituent of epidermis	DIFERENCIACIÓN	AUSENTE	AUSENTE	5,23E+01	4,98E+02
31424	keratinization	DIFERENCIACIÓN	3,72E-04	7,39E-03	8,45E-02	1,17E+00
35315	hair cell differentiation	DIFERENCIACIÓN	1,31E+01	1,50E+02	1,16E+01	1,31E+02
42386	hemocyte differentiation (sensu Arthropoda)	DIFERENCIACIÓN	AUSENTE	AUSENTE	5,23E+01	4,98E+02
42633	hair cycle	DIFERENCIACIÓN	1,31E+01	1,50E+02	1,16E+01	1,31E+02
48729	tissue morphogenesis	DIFERENCIACIÓN	1,49E-05	3,37E-04	2,69E-03	4,39E-02
48730	epidermis morphogenesis	DIFERENCIACIÓN	5,91E-05	1,20E-03	1,26E-02	1,83E-01
5853	eukaryotic translation elongation factor 1 complex	BIOSÍNTESIS	AUSENTE	AUSENTE	5,23E+01	4,98E+02
6416	protein biosynthesis	BIOSÍNTESIS	5,52E-64	6,72E-62	4,77E-67	5,45E-65
6996	organelle organization and biogenesis	BIOSÍNTESIS	8,30E+00	1,02E+02	3,32E+00	4,20E+01
7010	cytoskeleton organization and biogenesis	BIOSÍNTESIS	6,58E+00	8,49E+01	3,51E+00	4,39E+01
7028	cytoplasm organization and biogenesis	BIOSÍNTESIS	1,71E-01	2,61E+00	6,52E-01	8,75E+00
9058	biosynthesis	BIOSÍNTESIS	4,73E-42	3,29E-40	6,05E-47	3,95E-45
16043	cell organization and biogenesis	BIOSÍNTESIS	4,95E+01	4,63E+02	AUSENTE	AUSENTE
16282	eukaryotic 43S preinitiation complex	BIOSÍNTESIS	6,10E-40	3,72E-38	9,03E-41	4,58E-39
16283	eukaryotic 48S initiation complex	BIOSÍNTESIS	1,34E-49	1,09E-47	1,95E-50	1,49E-48
42254	ribosome biogenesis and assembly	BIOSÍNTESIS	1,13E+01	1,36E+02	7,95E+00	9,31E+01
42255	ribosome assembly	BIOSÍNTESIS	4,46E+01	4,21E+02	3,96E+01	4,06E+02
44249	cellular biosynthesis	BIOSÍNTESIS	2,77E-46	2,08E-44	2,71E-50	1,91E-48
5243	gap-junction forming channel activity	UNIÓN INTERCELULAR	2,69E+01	2,72E+02	2,26E+01	2,43E+02
5911	intercellular junction	UNIÓN INTERCELULAR	1,47E+01	1,65E+02	5,08E+01	4,98E+02
5921	gap junction	UNIÓN INTERCELULAR	5,31E+01	4,93E+02	4,49E+01	4,51E+02
5922	connexon complex	UNIÓN INTERCELULAR	2,69E+01	2,72E+02	2,26E+01	2,43E+02
7043	intercellular junction assembly	UNIÓN INTERCELULAR	8,47E+00	1,03E+02	AUSENTE	AUSENTE
15285	connexon channel activity	UNIÓN INTERCELULAR	2,69E+01	2,72E+02	2,26E+01	2,43E+02
30054	cell junction	UNIÓN INTERCELULAR	2,63E+01	2,72E+02	AUSENTE	AUSENTE
45216	intercellular junction assembly and maintenance	UNIÓN INTERCELULAR	1,60E+01	1,76E+02	AUSENTE	AUSENTE
6928	cell motility	OTRAS FUNCIONES	2,73E+01	2,72E+02	AUSENTE	AUSENTE
7566	embryo implantation	OTRAS FUNCIONES	3,67E+00	4,84E+01	AUSENTE	AUSENTE
40011	locomotion	OTRAS FUNCIONES	2,73E+01	2,72E+02	AUSENTE	AUSENTE
51674	localization of cell	OTRAS FUNCIONES	2,73E+01	2,72E+02	AUSENTE	AUSENTE

Continuación de la tabla 5.

REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	MEDIA CTR	MEDIA PERIO	MEDIA RELATIVA PERIO/CTR	TTEST PERIOvsCTR
1554963_at	---	CDNA clone IMAGE:5310797	11,13	1,77	0,16	0,006832317
242524_at	CBLN4	cerebellin 4 precursor	6,28	1,05	0,17	0,009182159
1556147_at	---	CDNA clone IMAGE:5274427	12,45	2,10	0,17	0,00217525
234448_at	---	MRNA; cDNA DKFZp434F1872 (from clone DKFZp434F1872)	7,45	1,53	0,21	0,002285471
236903_at	---	Transcribed locus	10,27	2,28	0,22	0,003869524
216999_at	EPOR	erythropoietin receptor	5,77	1,28	0,22	0,009483153
1563188_at	---	Homo sapiens, clone IMAGE:5168481, mRNA	11,63	2,68	0,23	0,009622777
216124_at	---	CDNA FLJ14096 fis, clone MAMMA1000752	8,05	1,93	0,24	0,004361092
232326_at	C8orf56	chromosome 8 open reading frame 56	19,78	4,90	0,25	0,005366611
1559732_at	NUB1	Negative regulator of ubiquitin-like proteins 1	11,98	3,25	0,27	0,003376427
1558001_s_at	ARID5B	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	7,55	2,07	0,27	0,004376348
242231_at	---	Transcribed locus	13,92	4,30	0,31	0,003757814
1559747_at	SPG11	spastic paraplegia 11 (autosomal recessive)	20,08	6,25	0,31	0,001054859
215924_at	---	CDNA FLJ12040 fis, clone HEMBB1001944	6,30	1,98	0,31	0,0048363
244244_at	---	Transcribed locus, strongly similar to NP_660316.1 CD300 molecule-like family member g [Homo sapiens]	10,23	3,28	0,32	0,008997762
233090_at	---	CDNA FLJ11419 fis, clone HEMBA1000985	14,73	4,77	0,32	0,001993457
238698_at	CASK	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)	12,80	4,23	0,33	0,00648691
204628_s_at	ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	20,58	6,98	0,34	0,003086866
1560842_a_at	---	CDNA FLJ35846 fis, clone TESTI2006877	8,68	2,97	0,34	0,002826318
1552373_s_at	C4orf33	chromosome 4 open reading frame 33	8,42	2,92	0,35	0,008218636
240109_at	---	Transcribed locus	10,65	3,72	0,35	0,004268564
221796_at	NTRK2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	136,20	48,37	0,36	0,00727738
1552957_at	LOC200383	similar to Dynein heavy chain at 16F	9,63	3,43	0,36	0,009952413
241279_at	---	---	12,08	4,32	0,36	0,002142858
211196_at	DBT	dihydroliipoamide branched chain transacylase E2	8,10	2,93	0,36	0,000422483
1562611_at	---	---	5,68	2,12	0,37	0,004849548
230644_at	LRFN5	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 5	10,73	4,07	0,38	0,001911244
232423_at	ARSD	arylsulfatase D	63,38	24,70	0,39	0,008872946
227634_at	STK32C	serine/threonine kinase 32C	29,48	11,75	0,40	0,006129392

Tabla 6: Análisis comparado de los genes/EST expresados significativamente diferente en los grupos control y periodontal. En azul, genes/EST sobreexpresados en el grupo control. En amarillo, genes/EST sobreexpresados en el grupo periodontal.

...continuación...

REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	MEDIA CTR	MEDIA PERIO	MEDIA RELATIVA PERIO/CTR	TTEST PERIOvsCTR
219591_at	CEND1	cell cycle exit and neuronal differentiation 1	31,88	13,00	0,41	0,004025523
215105_at	CG030	hypothetical gene CG030	12,03	4,92	0,41	0,005751788
1552917_at	IL29	interleukin 29 (interferon, lambda 1)	20,30	8,33	0,41	0,002155063
1563456_at	LOC285026	hypothetical protein LOC285026	7,92	3,32	0,42	0,004254123
1555856_s_at	---	CDNA FLJ37920 fis, clone CTONG1000181	20,13	8,53	0,42	0,005305017
232966_at	LPIN3	lipin 3	5,50	2,35	0,43	0,003516211
215485_s_at	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	44,48	19,52	0,44	0,002256781
229809_at	---	Transcribed locus	15,57	7,07	0,45	0,009971459
216696_s_at	PRODH2	proline dehydrogenase (oxidase) 2	27,72	12,63	0,46	0,005578283
219499_at	SEC61A2	Sec61 alpha 2 subunit (S. cerevisiae)	21,12	9,87	0,47	0,004465347
208365_s_at	GRK4	G protein-coupled receptor kinase 4	25,20	12,07	0,48	0,004900671
207923_x_at	PAX8	paired box 8	16,73	8,15	0,49	0,006446337
227192_at	PRRT2	proline-rich transmembrane protein 2	24,38	12,02	0,49	0,009054383
1565715_at	FUS	Fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)	7,47	14,95	2,00	0,006893261
1568702_a_at	PAAF1	proteasomal ATPase-associated factor 1	7,95	16,10	2,03	0,005978705
243962_at	---	Transcribed locus	8,88	18,25	2,05	0,001145203
241789_at	---	CDNA FLJ36544 fis, clone TRACH2006378	8,43	17,68	2,10	0,009405649
204713_s_at	F5	coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)	8,68	18,45	2,12	0,009071644
231144_at	SMARCD3	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3	1,45	3,12	2,15	0,004121318
1569698_s_at	---	CDNA clone IMAGE:4824433	6,03	13,07	2,17	0,008630388
202902_s_at	CTSS	cathepsin S	114,75	253,58	2,21	0,004073064
1561868_at	---	MRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 592473	9,02	20,18	2,24	0,007684653
239159_at	GOSR2	Golgi SNAP receptor complex member 2	12,30	28,25	2,30	0,007447717
210967_x_at	CACNB1	calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit	5,73	13,28	2,32	0,005436417
229723_at	TAGAP	T-cell activation RhoGTPase activating protein	72,02	172,65	2,40	0,007423427
206337_at	CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7	14,32	34,43	2,41	0,004533749

Continuación de la tabla 6.

...continuación...

REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	MEDIA CTR	MEDIA PERIO	MEDIA RELATIVA PERIO/CTR	TTEST PERIOvsCTR
210484_s_at	MGC31957 /// TNFRSF10C	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without an intracellular domain /// hypothetical protein MGC31957	7,90	19,17	2,43	0,009895495
240948_at	---	Transcribed locus	4,02	9,83	2,45	0,00720634
213870_at	COL11A2	collagen, type XI, alpha 2	6,55	16,07	2,45	0,008613629
230995_at	CMBL	carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas)	2,73	6,90	2,52	0,00894976
241054_at	---	Transcribed locus	7,37	19,17	2,60	0,000971969
1552504_a_at	BRSK1	BR serine/threonine kinase 1	7,45	19,53	2,62	0,004779191
1559756_at	DKFZp667F0711	hypothetical protein DKFZp667F0711	4,32	11,58	2,68	0,008913562
1563341_at	---	CDNA clone IMAGE:4831161	5,93	15,98	2,69	0,004641504
224034_at	---	Transcribed locus, weakly similar to NP_060312.1 hypothetical protein LOC55652 [Homo sapiens]	2,83	7,80	2,75	0,002632416
1555379_at	MGC52498	hypothetical protein MGC52498	3,68	10,65	2,89	0,005206074
241338_at	---	---	4,65	13,55	2,91	0,006517523
1561041_at	---	Homo sapiens, clone IMAGE:5534210, mRNA	2,42	7,05	2,92	0,006328333
219873_at	COLEC11	collectin sub-family member 11	5,88	17,37	2,95	0,003077836
207840_at	CD160	CD160 molecule	6,87	20,62	3,00	0,00668376
224031_at	---	---	5,40	16,25	3,01	0,002091562
234517_at	---	---	6,55	19,83	3,03	0,004740566
1552747_a_at	C3orf48	chromosome 3 open reading frame 48	2,87	8,92	3,11	0,004811809
1562582_at	RP11-756A22.3	Hypothetical LOC646405	3,02	9,47	3,14	0,006129193
1560550_at	---	Homo sapiens, clone IMAGE:5180210, mRNA	13,18	41,75	3,17	0,000223424
1560744_at	---	---	4,72	15,38	3,26	0,008254664
204622_x_at	NR4A2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	58,73	192,03	3,27	0,009931013
234575_at	ZNF71	zinc finger protein 71	9,47	31,22	3,30	0,001171063
243864_at	CCDC80	coiled-coil domain containing 80	4,03	13,60	3,37	0,000892227
233971_at	LOC401565	similar to 4931415M17 protein	4,45	15,03	3,38	0,001337139
230495_at	LOC150568	hypothetical LOC150568	3,07	10,57	3,45	0,000982682
1561778_at	---	MRNA upregulated during camptothecin-induced apoptosis of U937 cells	2,43	8,48	3,49	0,0043308
217072_at	CD300A	CD300a molecule	4,97	17,50	3,52	0,006941678
238429_at	TMEM71	transmembrane protein 71	6,73	25,02	3,72	0,000226128
234274_at	---	Transcribed locus	1,58	6,27	3,96	0,001185045
1553513_at	VNN3	vanin 3	3,58	14,28	3,99	0,009310529
240782_at	---	Transcribed locus	2,38	9,75	4,09	0,001879106

Continuación de la tabla 6.



...continuación.

REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	MEDIA CTR	MEDIA PERIO	MEDIA RELATIVA PERIO/CTR	TTEST PERIOvsCTR
1559971_at	BSDC1	BSD domain containing 1	3,32	13,62	4,11	0,005547165
234727_at	DNAH7	dynein, axonemal, heavy chain 7	3,92	16,08	4,11	0,00197958
233744_at	---	Uncharacterized gastric protein ZG33P	1,57	6,47	4,13	0,007821404
240065_at	FAM81B	family with sequence similarity 81, member B	2,22	9,18	4,14	0,002443602
1560943_s_at	---	---	4,10	18,67	4,55	0,006740678
211878_at	IGHG1	Immunoglobulin heavy constant mu	2,37	12,90	5,45	0,006518132
1561463_at	---	---	1,65	9,62	5,83	0,004750278
1556564_at	HHIPL1	HHIP-like 1	2,28	15,78	6,91	0,005626516
1559603_at	LOC283535	hypothetical protein LOC283535	2,00	14,57	7,28	0,009229934
207327_at	EYA4	eyes absent homolog 4 (Drosophila)	1,53	12,33	8,04	0,001405396

Continuación de la tabla 6.

REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	MEDIA CTR	MEDIA PERIO	MEDIA RELATIVA PERIO/CTR	TTEST PERIOvsCTR
232423_at	ARSD	arylsulfatase D	63,38	24,70	0,39	0,00887295
210202_s_at	BIN1	bridging integrator 1	41,85	23,75	0,57	0,00193527
232662_x_at	C10orf58	chromosome 10 open reading frame 58	441,43	270,60	0,61	0,00082301
243864_at	CCDC80	coiled-coil domain containing 80	4,03	13,60	3,37	0,00089223
220565_at	CCR10	chemokine (C-C motif) receptor 10	2,87	13,38	4,67	0,01072624
213965_s_at	CHD5	chromodomain helicase DNA binding protein 5	2,45	13,03	5,32	0,04743563
211196_at	DBT	dihydrolipoamide branched chain transacylase E2	8,10	2,93	0,36	0,00042248
228804_at	DGCR5	DiGeorge syndrome critical region gene 5 (non-coding)	12,17	24,27	1,99	0,00215289
201340_s_at	ENC1	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	16,40	29,50	1,80	0,00173529
207327_at	EYA4	eyes absent homolog 4 (Drosophila)	1,53	12,33	8,04	0,0014054
240065_at	FAM81B	family with sequence similarity 81, member B	2,22	9,18	4,14	0,0024436
219612_s_at	FGG	fibrinogen gamma chain	8,42	1,62	0,19	0,01097225
1554068_s_at	FLJ32549	hypothetical protein FLJ32549	34,07	19,35	0,57	0,02177809
235426_at	GATM	Glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	15,97	3,02	0,19	0,01018871
238518_x_at	GLYCK	glycerate kinase	33,12	18,98	0,57	0,00774755
1556564_at	HHIPL1	HHIPL-like 1	2,28	15,78	6,91	0,00562652
210013_at	HPX	hemopexin	3,87	21,98	5,69	0,047852
225715_at	KIAA1303	raptor	47,58	68,47	1,44	0,01617762
243836_at	KIAA1843	KIAA1843 protein	0,75	4,30	5,73	0,07486409
231287_s_at	Klkb4	plasma kallikrein-like protein 4	2,22	11,98	5,41	0,06375134
233971_at	LOC401565	similar to 4931415M17 protein 65	4,45	15,03	3,38	0,00133714
222202_at	LOC644213	Similar to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	0,78	9,08	11,60	0,02028342
230644_at	LRFN5	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 5	10,73	4,07	0,38	0,00191124
207121_s_at	MAPK6	mitogen-activated protein kinase 6	2951,82	2312,50	0,78	0,00636641
1554886_a_at	MLXIP	MLX interacting protein	2,53	10,75	4,24	0,03247359
219796_s_at	MUPCDH	mucin-like protocadherin	2,22	1,18	0,53	0,00124355
213955_at	MYOZ3	myozenin 3	2,98	10,65	3,57	0,01776912
230443_at	NHP2L1	NHP2 non-histone chromosome protein 2-like 1 (S. cerevisiae)	20,25	3,03	0,15	0,01776889
216096_s_at	NRXN1	neurexin 1	2,07	11,12	5,38	0,0363195
231725_at	PCDHB2	protocadherin beta 2	53,58	29,97	0,56	0,00918864
202789_at	PLCG1	phospholipase C, gamma 1	116,63	67,90	0,58	0,00371088

Tabla 7: Genes/EST del algoritmo clasificatorio. En azul, genes/EST sobreexpresados el doble en las muestras control «versus» muestras periodontales. En amarillo genes/EST sobreexpresados el doble en las muestras periodontales «versus» muestras control. En rojo, valores estadísticamente significativos.

...continuación.

REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	MEDIA CTR	MEDIA PERIO	MEDIA RELATIVA PERIO/CTR	TTEST PERIOvsCTR
231287_s_at	Klkb14	plasma kallikrein-like protein 4	2,22	11,98	5,41	0,06375134
233971_at	LOC401565	similar to 4931415M17 protein	4,45	15,03	3,38	0,00133714
222202_at	LOC644213	Similar to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	0,78	9,08	11,60	0,02028342
230644_at	LRFN5	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 5	10,73	4,07	0,38	0,00191124
207121_s_at	MAPK6	mitogen-activated protein kinase 6	2951,82	2312,50	0,78	0,00636641
1554886_a_at	MLXIP	MLX interacting protein	2,53	10,75	4,24	0,03247359
219796_s_at	MUPCDH	mucin-like protocadherin	2,22	1,18	0,53	0,00124355
213955_at	MYOZ3	myozenin 3	2,98	10,65	3,57	0,01776912
230443_at	NHP2L1	NHP2 non-histone chromosome protein 2-like 1 (S. cerevisiae)	20,25	3,03	0,15	0,01776889
216096_s_at	NRXN1	neurexin 1	2,07	11,12	5,38	0,0363195
231725_at	PCDHB2	protocadherin beta 2	53,58	29,97	0,56	0,00918864
202789_at	PLCG1	phospholipase C, gamma 1	116,63	67,90	0,58	0,00371088
232629_at	PROK2	prokineticin 2	4,42	35,08	7,94	0,05457481
220553_s_at	PRPF39	PRP39 pre-mRNA processing factor 39 homolog (S. cerevisiae)	195,18	132,33	0,68	0,01135507
223554_s_at	RANGRF	RAN guanine nucleotide release factor	17,10	30,67	1,79	0,0060495
204535_s_at	REST	RE1-silencing transcription factor	6,27	14,42	2,30	0,01702323
229179_at	RUFY1	RUN and FYVE domain containing 1	1,68	6,82	4,05	0,01531084
203380_x_at	SFRS5	splicing factor, arginine/serine-rich 5	949,47	1264,72	1,33	0,00521686
238429_at	TMEM71	transmembrane protein 71	6,73	25,02	3,72	0,00022613
217143_s_at	TRA@ /// TRD@	T cell receptor alpha locus /// T cell receptor delta locus	20,08	53,68	2,67	0,01181614
214672_at	TTLL5	tubulin tyrosine ligase-like family, member 5	144,03	125,35	0,87	0,01411922
224747_at	UBE2Q2	ubiquitin-conjugating enzyme E2Q (putative) 2	967,83	666,13	0,69	0,01163514
244293_at	UQCRB	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	26,73	15,78	0,59	0,00057661
232497_at	ZNF3	zinc finger protein 3	5,57	11,35	2,04	0,01553058
239538_at	ZRANB3	zinc finger, RAN-binding domain containing 3	40,37	27,52	0,68	0,0045356
1556111_s_at	---	CDNA FLJ39819 fis, clone SPLEN2010534	26,82	15,95	0,59	0,05053384
1556147_at	---	CDNA clone IMAGE:5274427	12,45	2,10	0,17	0,00217525
1557816_a_at	---	Homo sapiens, clone IMAGE:3453782, mRNA	3,70	10,68	2,89	0,02862487
1560550_at	---	Homo sapiens, clone IMAGE:5180210, mRNA	13,18	41,75	3,17	0,00022342
1560842_a_at	---	CDNA FLJ35846 fis, clone TESTI2006877	8,68	2,97	0,34	0,00282632
1560943_s_at	---	---	4,10	18,67	4,55	0,00674068
1563341_at	---	CDNA clone IMAGE:4831161	5,93	15,98	2,69	0,0046415
244238_at	---	Transcribed locus, moderately similar to XP_001137143.1 PREDICTED: hypothetical protein [Pan troglodytes]	5,97	18,57	3,11	0,01733902

Continuación de la tabla 7.

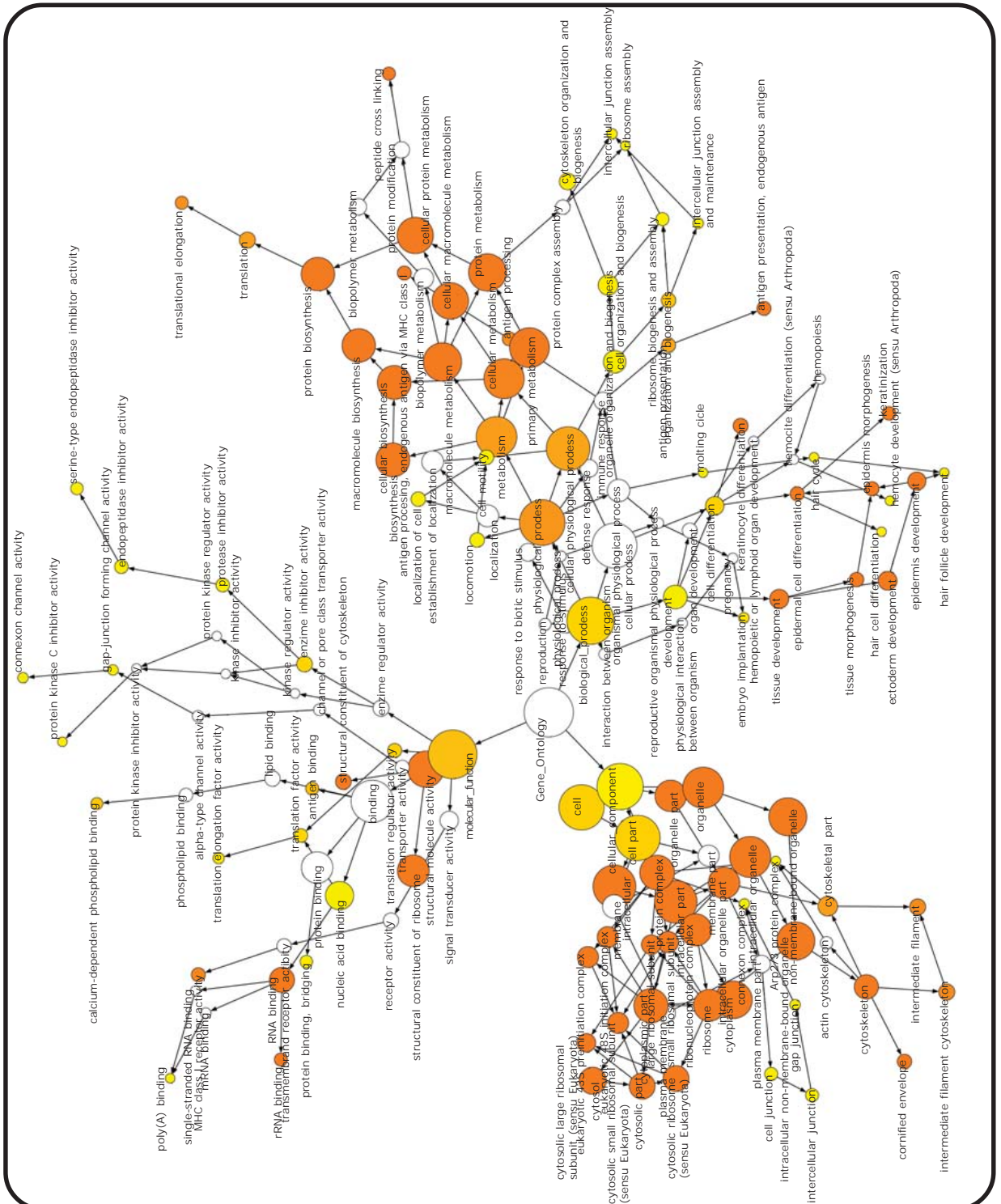


Fig. 13: Representación de las funciones génicas en el grupo control por la aplicación BINGO para Cytoscape



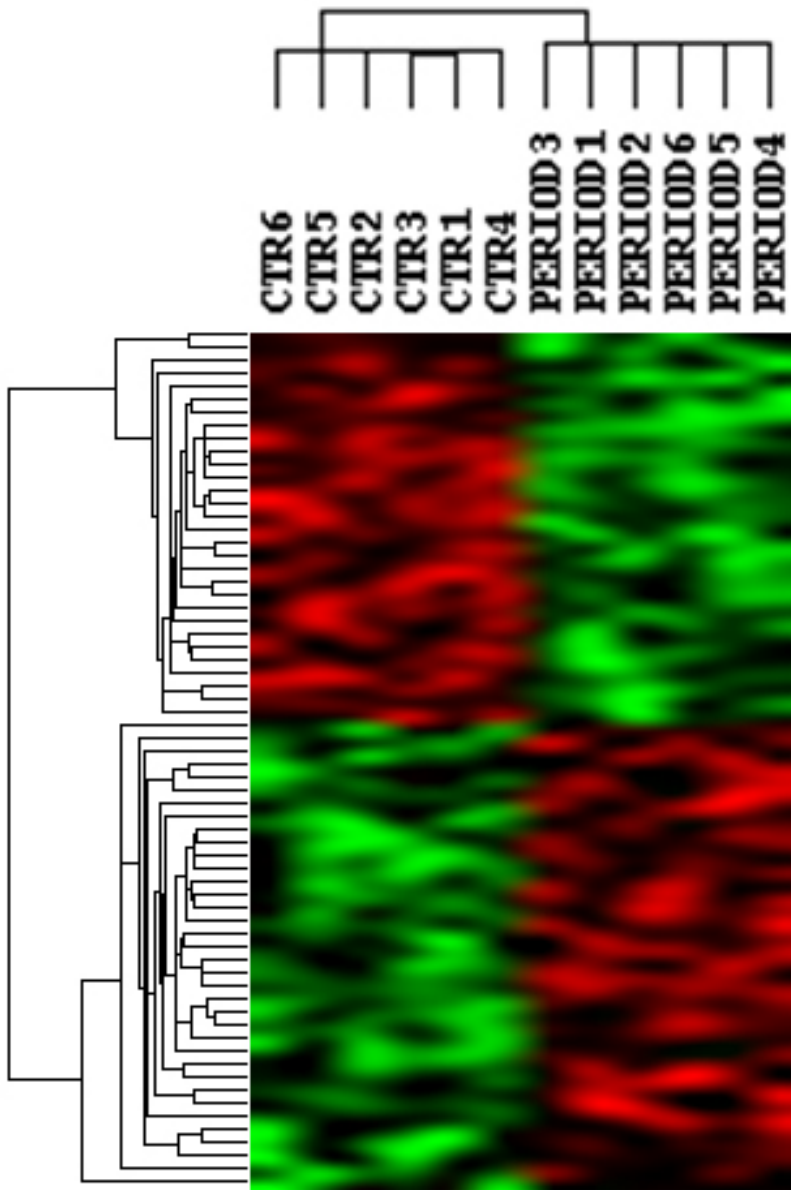


Fig. 15: Algoritmo clasificatorio. En verde, genes/EST sobreexpresados. En rojo, genes/EST infraexpresados

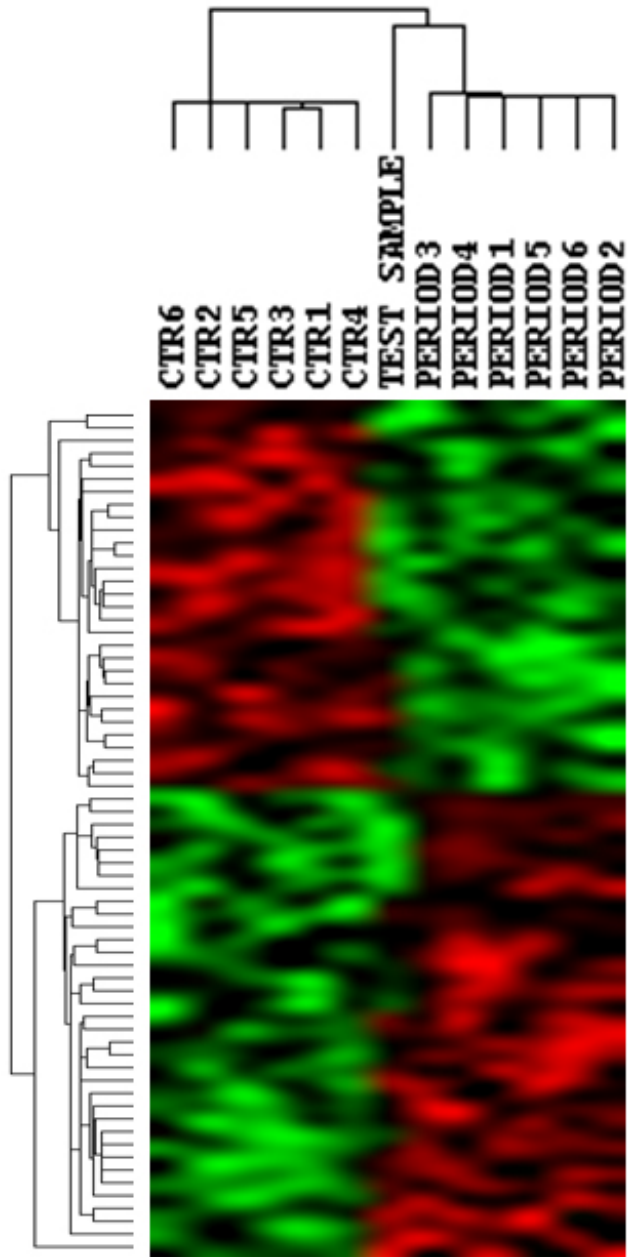


Fig. 16: Clasificación de una muestra test utilizando el algoritmo clasificatorio. En verde, genes/EST sobreexpresados. En rojo, genes/EST infraexpresados







DISCUSIÓN



En el presente apartado de esta Tesis Doctoral se realizará en primer lugar la discusión de la metodología utilizada y, tras ello, la valoración de los resultados obtenidos, haciendo referencia en primer lugar a los genes y secuencias génicas cuyos niveles de expresión han sido mayores en las muestras de encía sana o en las periodontalmente afectadas para, después, analizar las diferencias derivadas de las funciones génicas desempeñadas por dichos genes/EST y, finalmente, establecer un algoritmo clasificatorio específico mediante el cual facilitar el diagnóstico de la enfermedad periodontal.

Respecto a la metodología seguida en esta Tesis Doctoral se han seguido los criterios utilizados habitualmente en los estudios realizados sobre el tema, en cuanto a los criterios de selección de las muestras, procedimiento de obtención de las mismas y tratamiento de éstas.

El sistema de *Microarray* utilizado supone el estudio de 54.613 genes/EST en cada espécimen obtenido, lo que permite identificar cualquier actividad o función que se esté produciendo en las células en el momento de ser tomada la muestra, ya que entre dichos 54.613 genes/

EST se encuentran todos aquellos que pueden ser expresados por el ARN de las células humanas. El elevado número de datos, decenas de miles de genes/EST, permite hacer una comparación exhaustiva de los procesos biológicos y moleculares que acontecen en los tejidos periodontales sanos y en aquellos afectados de enfermedad periodontal, y así poder revelar el diferente comportamiento de las células en estado de salud y enfermedad. Estas técnicas permiten, por tanto, establecer perfiles globales de expresión génica y estudiar todas las funciones celulares en un único experimento.

La selección de pacientes se hizo de forma aleatoria, como en los estudios realizados hasta el momento sobre la materia. El diagnóstico de enfermedad periodontal se hizo mediante la realización de un examen periodontal clínico habitual, atendiendo a los criterios diagnósticos establecidos por la Academia Americana de Periodoncia: la presencia de signos de inflamación (expresada como gingivorragia al sondaje periodontal clínico habitual) y la presencia de bolsas periodontales (detectada por el sondaje periodontal clínico habitual con pérdida de inserción clínica mayor de 3 mm) (AAP, 2003; Flemmig, 1999), tal y

- 
- AAP. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Diagnosis of periodontal diseases. J Periodontol 2003; 74: 1237-1247.
  - Flemmig TF. Periodontitis. Ann Periodontol 1999; 4: 32-37.

como se ha explicado en el apartado correspondiente de material y métodos, y coincidentes con los criterios de inclusión/exclusión que se han utilizado en el único trabajo similar a éste que se ha publicado hasta el momento (Demmer *et al.*, 2008), así como en otros trabajos que sobre los procesos biológicos y o moleculares que se correlacionan con la enfermedad periodontal han sido publicados por distintos autores (AAP, 1999).

El uso de la sonda Florida como medio para determinar la profundidad de sondaje ha sido validado por diversos estudios, como el de Araujo *et al.* (Araujo *et al.*, 2003) en el que tres examinadores realizan dos sondajes distanciados 14 días sobre 20 voluntarios y donde se obtienen unas medidas de reproductibilidad con errores inferiores a 0'5 mm. Es por ello, que el uso de la sonda Florida permitió eliminar los sesgos derivados de la variabilidad intraobservador.

En lo referente a los criterios de inclusión y exclusión, se han descartado del estudio a los pacientes

fumadores habituales por la alteración en la expresión génica que genera el tabaco por sí mismo, como lo corrobora el estudio «*ex Vivo*» de Ryder *et al.* (Ryder *et al.*, 2004), donde estudia mediante un análisis con *Microarray* la variación en la expresión génica del ARNm de un cultivo de células sanguíneas mononucleares obtenidas de cuatro pacientes sanos no fumadores debida a la exposición aguda, durante 5 minutos, al humo de tabaco; y en el cual encuentra 90 genes sobreexpresados (de los cuales 20 han sido relacionados en estudios previos con la patogenia de la enfermedad periodontal y 16 relacionados con procesos inflamatorios) y 19 genes infraexpresados, al igual que 18 EST sobreexpresadas y 26 EST infraexpresadas por la acción directa del tabaco sobre dicho cultivo celular.

En otro estudio «*ex Vivo*», en este caso sobre un modelo celular de leucoplasia oral (células MSK-Leuk1), se encontró una alteración en la expresión de 411 genes (con una media relativa de al menos 1'5), debida a la aplicación sobre dicho

- 
- Demmer RT, Behle JH, Wolf DL, Handfield M, Kebschull M, Celenti R, Pavlidis P, Papapanou PN. Transcriptomes in healthy and diseased gingival tissues. *J Periodontol* 2008; 79: 2112-2124.
  - AAP. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol* 1999; 70: 457-470.
  - Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. *J Periodontol* 2003; 74: 1736-1740.
  - Ryder MI, Hyun W, Loomer P, Haqq C. Alteration of gene expression profiles of peripheral mononuclear blood cells by tobacco smoke: implications for periodontal diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 39-49.

modelo de un extracto de humo de tabaco. Dichos genes están relacionados con funciones concernientes con la proliferación celular, la inflamación, la apoptosis, y la lesión tisular (Gümüs *et al.*, 2008). Además, se evaluó la concordancia de los datos de los genes más expresados en ese estudio comparándolos con 9 muestras de pacientes no fumadores y 9 muestras de pacientes fumadores habituales analizando la expresión con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), confirmándose los resultados para los genes estudiados.

Igualmente se ha observado un aumento de la expresión de las metaloproteinasas (MMP) al aplicar humo de cigarro sobre células endoteliales (Perlstein y Lee, 2006). En este trabajo se realiza una revisión sobre la relación entre el tabaco, las enfermedades vasculares asociadas a éste, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el papel que

desempeña el tabaco actuando sobre las MMP, concluyendo que la inflamación inducida por el humo de tabaco y el estrés oxidativo tienen la capacidad de inducir e inhibir la actividad de las MMP en múltiples niveles, como activando los factores transcriptivos de la inflamación, o activando a la NF- $\kappa$ B, que a su vez regula la secreción de MMP-1, MMP-3 y MMP-9; procesos que tan relacionados están con la patología de la enfermedad periodontal (Reynolds *et al.*, 1994; Sorsa *et al.*, 2004).

También es relevante mencionar los trabajos realizados estudiando no ya los cambios generados por el humo de tabaco sino por otros de los más de 100 componentes mutágenos, carcinógenos y promotores tumorales de éste (Hecht, 2003), como los de Li *et al.* (Li *et al.*, 2002) sobre las alteraciones de la expresión génica provocada por la nicotina, y Koshi *et al.* (Koshi *et al.*, 2007) que tras analizar mediante *Microarray* de ADN 8.500

- 
- Gümüs ZH, Du B, Kacker A, Boyle JO, Bocker JM, Mukherjee P, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ, Weinstein H. Effects of tobacco smoke on gene expression and cellular pathways in a cellular model of oral leukoplakia. *Cancer Prev Res* 2008; 1: 100-111.
  - Perlstein TS, Lee RT. Smoking, metalloproteinases, and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 250-256.
  - Reynolds JJ, Hembry RM, Meikle MC. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. *Adv Dent Res* 1994; 8: 312-319.
  - Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Diseases* 2004; 10: 311-318.
  - Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 733-44.
  - Li MD, Konu O, Kane JK, Becker KG. Microarray technology and its application on nicotine research. *Mol Neurobiol* 2002; 25 : 265-285.
  - Koshi R, Sugano N, Orii H, Fukuda T, Ito K. Microarray analysis of nicotine-induced changes in gene expression in a macrophage-like human cell line. *J Periodontal Res* 2007 ;42: 518-526.

genes expresados por un cultivo de células de tipo macrófago (U937) al que trata con 1 µg/ml de nicotina durante una hora, detecta la expresión de 4.914 genes, de los cuales 118 genes se encuentran sobreexpresados y 97 infraexpresados (considerando como tales aquellos cuya media relativa fuese mayor > 2'0 y corroborando los resultados mediante RT-PCR), entre los cuales se hallan genes relacionados con la inflamación y otras respuestas inmunes, como la fosfolipasa A2 y el interferón. Concluyen es este estudio que la nicotina causa un exceso de la respuesta inflamatoria y una alteración de la respuesta inmune frente a los patógenos.

De igual modo se ha tenido en cuenta la alteración de la vascularización que produce el tabaco, como lo demuestra el clásico estudio de Bergström y Floderus-Myrhed (Bergström y Floderus-Myrhed, 1983) sobre gemelos, en el cual se demuestra un menor sangrado gingival en una persona fumadora frente a su gemelo control; o el artículo de Preber y Bergström (Preber

y Bergström, 1985) en el que obtiene una conclusión similar en un estudio realizado entre enfermos periodontales fumadores y enfermos periodontales no fumadores. Todo ello podría provocar un error en el diagnóstico y selección de las muestras de mucosa oral.

Así mismo se han excluido a los pacientes con enfermedades sistémicas, como pacientes con discrasias sanguíneas, cuya enfermedad podría alterar la sintomatología propia de la enfermedad periodontal (Kasper *et al.*, 2006) *v.gr.* la presencia de signos como gingivorragia y agrandamiento gingival, como se demuestra en un estudio de Genc *et al* en el que encuentran un infiltrado de células inflamatorias en 28 pacientes con leucemia y los cuales presentan además una hiperplasia gingival (Genc *et al.*, 1998), o en un caso presentado por Pereira *et al* sobre un paciente con Síndrome Mielodisplásico con sangrado gingival espontáneo e hiperplasia gingival generalizada asociada a ésta (Pereira *et al.*, 2004).

- 
- Bergström J, Floderus-Myrhed B. Co-twin control study of the relationship between smoking and some periodontal disease factors. *Community Dent Oral Epidemiol* 1983; 11: 113-116.
  - Preber H, Bergström J. Occurrence of gingival bleeding in smoker and non-smoker patients. *Acta Odontol Scand* 1985; 43: 315-320.
  - Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Isselbacher KJ. *Harrison Principios de medicina interna*. 16ª Edición. México: McGraw-Hill Interamericana; 2006.
  - Genc A, Atalay T, Gedikoglu G, Zulfikar B, Kullu S. Leukemic children: clinical and histopathological gingival lesions. *J Clin Pediatr Dent* 1998; 22: 253-256.
  - Pereira CM, Gasparetto PF, Coracin FL, Marquês JF, Lima CS, Corrêa ME. Severe gingival bleeding in a myelodysplastic patient: management and outcome. *J Periodontol* 2004 Mar; 75: 483-486.

Se han descartado los pacientes con lesiones o infecciones locales próximas a la región de obtención de las muestras, como la presencia de mucositis, por la alteración que produce en la expresión de genes relacionados con los procesos inflamatorios, como se confirma en un artículo de Patil y Kirkwood donde se revisa la actividad de cascadas enzimáticas inespecíficas de inflamación o remodelación ósea (como las relaciones Receptor-Activador del factor nuclear  $\kappa$  b (RANK)/ligando de unión al Receptor Activador del factor nuclear  $\kappa$  b (RANKL)/osteoprotegerina (OPG), inducción de prostaglandina E2 vía ciclooxigenasa 2, entre otras) en procesos patológicos como la mucositis y la enfermedad periodontal y en la cual destacan la acción del *p38 mitogen-activated protein kinase* (MAPK) y del *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), indicando igualmente la acción de enzimas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) o la interleuquina 8 (IL-8) (Patil y Kirkwood, 2007).

La presencia de caries en las inmediaciones a la zona a biopsiar ha sido igualmente un criterio de exclusión, debido a que la caries y el

tejido pulpar afectado en tal caso, producen una alteración en la expresión génica, como queda demostrado en un estudio de Pääkkönen *et al* (Pääkkönen *et al.*, 2005) en el que analiza la expresión de genes y de proteínas del tejido pulpar de 42 terceros molares sanos y 62 terceros molares cariados (incluyendo como tales a aquellos que presentasen una caries de esmalte en grado avanzado o caries dentinaria en grado inicial a moderado) mediante *Microarray* de ADNc y gel de electroforesis bidimensional, y confirmando los hallazgos mediante RT-PCR. En dicho estudio se destaca la mayor expresión de 12 genes (los cuales además se encuentran en niveles de expresión muy altos) en el tejido pulpar de dientes cariados en comparación con el tejido pulpar de dientes sanos, y 3 genes sobreexpresados en los dientes sanos comparado con los dientes cariados. Entre las funciones desempeñadas por los genes sobreexpresados en una y otra muestra se encuentran la inflamación, la diferenciación celular y la modificación de la estructura vascular y nerviosa. En otro estudio realizado con *Microarray* sobre 12 premolares y molares sanos extraídos por motivos ortodóncicos y 11

- Patil CS, Kirkwood KL. p38 MAPK signaling in oral-related diseases. Dent Res 2007; 86: 812-825.

- Pääkkönen V, Ohlmeier S, Bergmann U, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Analysis of gene and protein expression in healthy and carious tooth pulp with cDNA microarray and two-dimensional gel electrophoresis. Eur J Oral Sci 2005; 113: 369-379.

cariados llevado a cabo por McLachlan *et al* (McLachlan *et al.*, 2005) se demuestra la sobreexpresión de 85 genes en el tejido pulpar de los dientes sanos (correspondientes con 12 funciones relacionadas con procesos biológicos y con 20 funciones moleculares) y la de 360 genes sobreexpresados en el tejido pulpar de los dientes cariados (los cuales corresponden a 25 procesos biológicos y a 21 funciones moleculares).

Una vez realizada la discusión de la metodología clínica empleada en esta Tesis Doctoral, se va a proceder con la de la técnica utilizada para la determinación de los niveles de expresión de los genes/EST de cada muestra.

Desde hace tiempo se han desarrollado diversas técnicas cuyo fin es determinar la expresión génica de las células. Una de dichas técnicas es la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR en sus siglas en inglés), donde el ARNm obtenido se transforma en ADNc y se genera mediante transcripción inversa un intermediario de doble cadena que posteriormente se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa. (Freeman *et al.*, 1999)

Otra de las técnicas utilizadas es la identificación de secuencias de ARNm mediante Northern Blot, donde el ARNm se transfiere a una membrana de nylon o nitrocelulosa y se hibrida a una sonda de ácido nucleico marcada, detectándose la señal que emite para determinar la expresión o no de un gen determinado (Lodish *et al.*, 2003)

Estas dos técnicas han sido hasta hace poco tiempo unas de las pocas herramientas que permitían estudiar la expresión génica de las células a nivel de ARN, pero tienen el inconveniente de que el número de genes que pueden identificar a la vez es muy limitado, sobre todo tras los avances en la obtención de la secuencia completa del genoma humano, lo que lleva consigo la necesidad de identificar miles de genes a la vez.

Actualmente se dispone de otra técnica para el estudio de la expresión génica, denominada Microensayo, Micromatriz Multigénica o *Microarray* (en su denominación anglosajona y más comúnmente utilizada). Dentro de sus diversas variantes (de ADN, de proteínas y de ARN), el *Microarray* de ARN permite identificar los niveles

- 
- McLachlan JL, Smitha AJ, Bujalska IJ, Cooper PR. Gene expression profiling of pulpal tissue reveals the molecular complexity of dental caries. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1741: 271-281.
  - Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* 1999; 26: 112-125.
  - Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. Molecular genetic techniques and genomics. En: *Molecular cell biology*, 5th edition. New York: W H Freeman 2003; 351-403.




de expresión de cada uno de los genes y secuencias génicas existentes en una célula en un momento determinado. De este *Microarray* de expresión existen dos tipos, *Microarray* de ADNc en el cual es posible identificar cientos de genes a la vez; y *Microarray* de Oligonucleótidos de Alta Densidad, que permite la identificación de todos los genes capaces de ser expresados por las células humanas (Freeman *et al.*, 2000).

Desde que al inicio de los años 90 se desarrollara la técnica, el *Microarray* de Oligonucleótidos se ha utilizado en múltiples estudios en diversos campos de la Medicina y con

propósitos de distinta índole, como en el ámbito oncológico (Alaminos *et al.*, 2003; Alaminos *et al.*, 2005; DeRisi *et al.*, 1996; Quackenbush, 2006; Todd y Wong 2002), en el estudio de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple (Bomprezzi *et al.*, 2003), enfermedades del aparato musculoesquelético, como la distrofia muscular esquelética (Haslett y Kunkel, 2002) o la artritis reumatoide (van der Pouw Kraan *et al.*, 2007;), y en el estudio y comparación de tejidos sanos y cultivos celulares de tejidos (Alaminos *et al.*, 2007); y se prevé que pueda convertirse en un futuro próximo en una herramienta estándar en el uso clínico.

- 
- Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *BioTechniques* 2000; 29: 1042-1055.
  - Alaminos M, Mora J, Cheung NK, Smith A, Qin J, Chen L, Gerald WL. Genome-wide analysis of gene expression associated with MYCN in human neuroblastoma. *Cancer Res* 2003; 63: 4538-4546.
  - Alaminos M, Gerald WL, Cheung NK. Prognostic value of MYCN and ID2 overexpression in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 45: 909-915.
  - DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M. Use of a cDNA microarray to analyze gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 1996; 14: 457-460.
  - Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med* 2006; 354: 2463-2472.
  - Todd R, Wong DT. DNA hybridization arrays for gene expression analysis of human oral cancer. *J Dent Res* 2002; 81: 89-97.
  - Bomprezzi R, Ringer M, Kim S. Gene expression profiles in multiple sclerosis patients and healthy controls: Identifying pathways relevant to disease. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2191-2199.
  - Haslett JN, Kunkel LM. Microarray analysis of normal and dystrophic skeletal muscle. *Int J Dev Neurosci* 2002; 20: 359-365.
  - van der Pouw Kraan TC, van Baarsen LG, Rustenburg F, Baltus B, Fero M, Verweij CL. Gene expresión profiling in rheumatology. *Methods Mol Med* 2007; 136: 305-327.
  - Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Andrades M, Fernández-Montoya A, Campos A. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1: 350-359.



Una vez desarrollada la discusión metodológica se van a valorar los resultados reflejados en esta Tesis Doctoral:

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral reflejan que, de los 54.613 genes/EST estudiados, 375 genes/EST muestran una expresión media mayor de 5.000 u.f. en uno y/ u otro grupo estudiado. En el grupo control fueron 353 los genes/EST que se expresaron en más de 5.000 u.f., mientras que en el grupo periodontal lo hicieron 345 genes/EST. 30 genes/EST se expresaron más de 5.000 u.f. exclusivamente en las muestras control, mientras que 22 genes/EST lo hicieron sólo en las muestras periodontales. Estos datos relacionados con la cantidad de genes expresados en las muestras control y periodontal revelan unos valores numéricos muy semejantes entre ambos tipos de muestras, de lo que se podría deducir que el número de genes involucrados en la enfermedad periodontal y por tanto con un papel trascendental en su origen y desarrollo, es muy bajo (52 genes/EST, lo que representa un 0'95 % del global de genes/EST analizados), con lo que se concluiría en que el inicio y la evolución de la enfermedad periodontal estribaría principalmente

en la expresión de un pequeño y determinado número de genes/EST más que en una diferencia numérica significativa de éstos en uno u otro caso.

Debido a la novedad de la técnica de análisis utilizada en esta Tesis Doctoral, a fecha actual sólo es posible encontrar un artículo, de publicación reciente, en el cual se utiliza la técnica de *Microarray* de Oligonucleótidos específicamente para el estudio de la expresión génica entre muestras de mucosa oral sanas y muestras de mucosa oral sanas con afección periodontal (Demmer *et al.*, 2008), realizado sobre 90 pacientes de los que obtuvieron un total de 247 muestras. Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral coinciden en un gran porcentaje con los datos reflejados en dicho artículo. De los 375 genes/EST con una expresión media mayor de 5.000 unidades fluorescentes (u.f.) en las muestras control y/o en las muestras periodontales en nuestra tesis, 261 (lo que representa el 69'6%) figuran entre los genes/EST significativamente sobreexpresados en el artículo de Demmer *et al.* De estos 261 genes/EST, 242 de ellos se encuentran con una expresión mayor en el mismo tipo de muestra que en las muestras de esta Tesis Doctoral (92'72%), 24 de

---

- Demmer RT, Behle JH, Wolf DL, Handfield M, Keschull M, Celenti R, Pavlidis P, Papapanou PN. Transcriptomes in healthy and diseased gingival tissues. *J Periodontol* 2008; 79: 2112-2124.

los cuales corresponden a genes/EST cuyos valores de más de 5.000 u.f. se dan exclusivamente en muestras control y 13 genes/EST cuya expresión de más de 5.000 u.f. se produce exclusivamente en las muestras periodontales). 19 genes/EST de los 261 que figuran también en el trabajo de Demmer *et al* (7'28%) se encuentran sobreexpresados en la muestra contraria en esta Tesis Doctoral (2 genes/EST con una expresión de más de 5.000 u.f. exclusivamente en las muestras control y 2 exclusivamente en las muestras periodontales) (Fig. 17). Esta amplia concordancia de datos sugiere que la técnica empleada en nuestra tesis doctoral y en el estudio de Demmer *et al* puede ser una buena herramienta para evaluar la alteración periodontal. Las pequeñas diferencias existentes con el estudio analizado podrían estar en relación con el tamaño muestral usado y la exhaustividad para considerar un gen sobreexpresado (5.000 u.f.) de nuestro estudio.

En lo referente a los genes/EST cuya sobreexpresión es significativamente mayor en las muestras control frente a las muestras periodontales o viceversa, los resultados de esta Tesis Doctoral revelan la existencia de un total de 96 genes/EST diferentemente expresados, de los cuales 54 se

encuentran reflejados en el artículo de Demmer *et al* (56'25%). De estos 54 genes/EST, en 37 casos (68'52%) coincide el tipo de muestra en la que existe una sobreexpresión en el artículo de Demmer *et al* con el tipo de muestra en esta Tesis Doctoral, mientras que en 17 casos (31'48%) la sobreexpresión ocurre en muestras del tipo contrario (Fig. 18).

Existe otro estudio que utiliza el *Microarray* de Oligonucleótidos para analizar células sanguíneas de 2 pacientes con periodontitis agresiva localizada frente a 3 pacientes con periodontitis agresiva generalizada y frente a 2 muestras control, en la que obtienen 53 genes expresados de forma diferencial entre las muestras de periodontitis agresiva localizada y las muestras control, y sólo 3 genes expresados de forma distinta entre las muestras control y las de periodontitis agresiva generalizada (Sørensen *et al.*, 2008). De todos ellos, sólo un gen (el *RPS26*) coincide con los datos de esta Tesis Doctoral. Ello puede ser debido a que dicho artículo es menos específico en relación a la expresión de células directamente involucradas en la enfermedad periodontal, ya que mientras en la presente Tesis Doctoral se analiza específicamente la expresión de queratinocitos y células estromales de los tejidos periodontales, en el artículo de

- Sørensen LK, Havemose-Poulsen A, Sonder SU, Bendtzen K, Holmstrup P. Blood cell gene expression profiling in subjects with aggressive periodontitis and chronic arthritis. *J Periodontol* 2008; 79: 477-485.

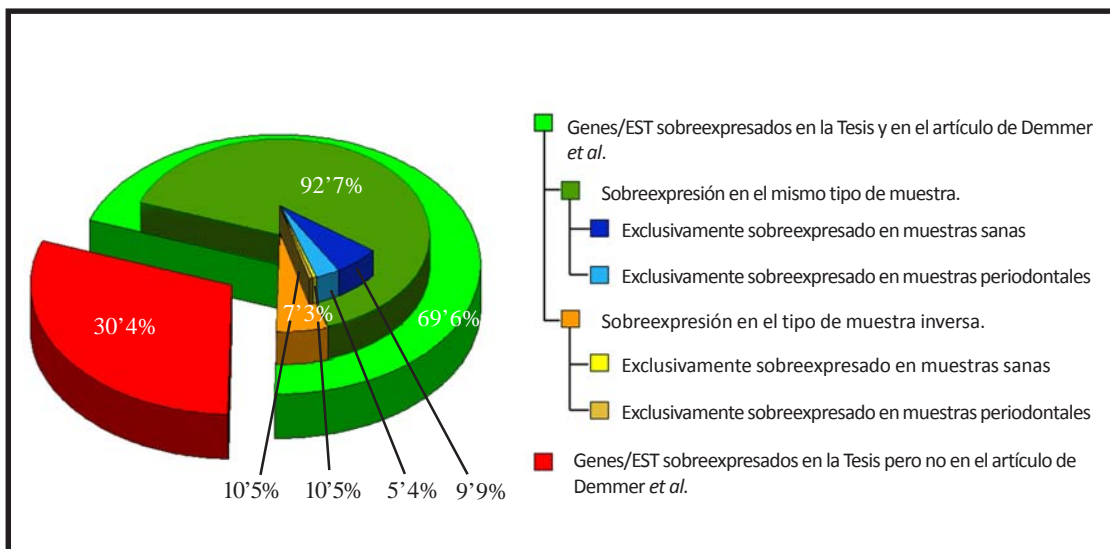


Fig. 17: Gráfico comparativo entre los genes/EST sobreexpresados en más de 5.000 u.f. en esta Tesis Doctoral y los resultados del artículo de Demmer *et al.*

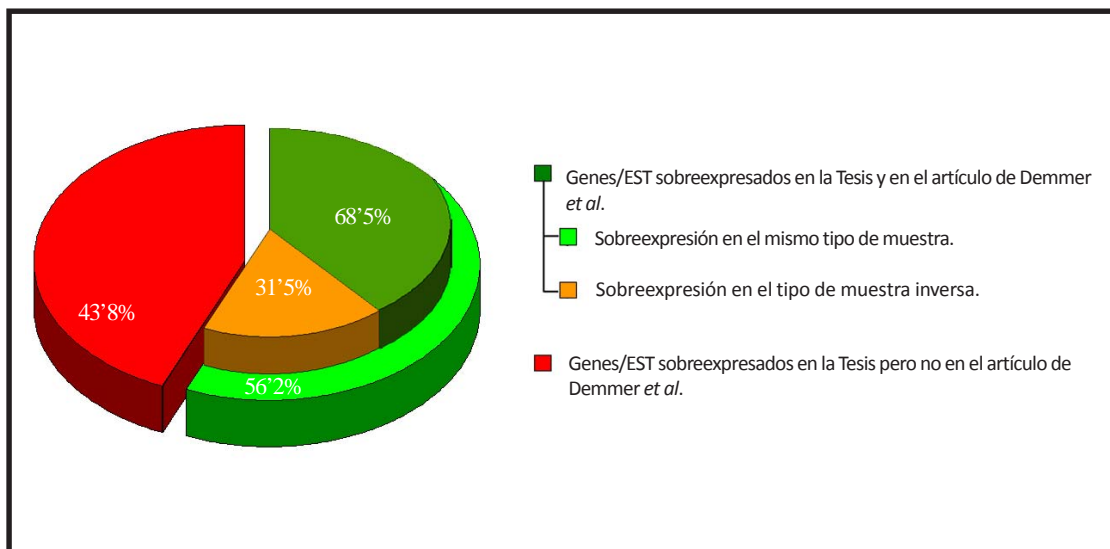


Fig. 18: Gráfico comparativo entre los genes/EST sobreexpresados exclusivamente en una u otra muestra en esta Tesis Doctoral y los resultados del artículo de Demmer *et al.*

Sørensen *et al* se analiza de células obtenidas de muestras sanguíneas extraídas a los pacientes. Además, el hecho de referirse el estudio de Sørensen *et al* únicamente a periodontitis agresivas, la no identificación de si la toma de las muestras se realiza estando la enfermedad periodontal activo o no, y el que la población de estudio sean 7 mujeres menores de 35 años podrían haber contribuido a la existencia de la escasa concordancia entre los resultados de expresión de estos dos trabajos.

En esta Tesis Doctoral no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de algunos genes/EST clásicamente relacionados con la enfermedad periodontal, como es el caso de las interleuquinas, el interferón gamma, el factor de necrosis tumoral, las metaloproteinasas, los inhibidores tisulares de metaloproteinasas, el factor de crecimiento transformante beta, o las betadefensinas que sí han

sido identificadas en otros trabajos como los de Kubota *et al*, Okada y Murakami, y Vardar-Sengul *et al* (Kubota *et al.*, 2008; Okada y Murakami, 1998; Vardar-Sengul *et al.*, 2007), posiblemente por el hecho de haber determinado unos márgenes elevados (más de 5.000 u.f.) para considerar los genes/EST como sobreexpresados, el tamaño muestra inicial así como por el hecho de no haber diferenciado entre distintos tipos de alteración periodontal, en algunos de los cuales estarían específicamente involucrados estos genes, *v.gr.* periodontitis agresivas (Garlet *et al.*, 2004; Sørensen *et al.*, 2008). Habrá por lo tanto que realizar más estudios en los que se analicen de forma individualizada los distintos tipos de enfermedad periodontal para determinar la expresión génica y el papel de cada gen en cada una de las diversas clases de enfermedad periodontal, así como estudios con una mayor población muestral para eliminar las pequeñas diferencias y sesgos que se puedan producir.

- 
- Kubota T, Itagaki M, Hoshino C, Nagata M, Morozumi T, Kobayashi T, Takagi R, Yoshie H. Altered gene expression levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in periodontitis-affected gingival tissue. *J Periodontol* 2008; 79: 166-173.
  - Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 248-266.
  - Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Periodontol Res* 2007; 42: 429-437.
  - Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 671-679.
  - Sørensen LK, Havemose-Poulsen A, Sonder SU, Bendtzen K, Holmstrup P. Blood cell gene expression profiling in subjects with aggressive periodontitis and chronic arthritis. *J Periodontol* 2008; 79: 477-485.

Con respecto a los datos obtenidos sobre las funciones génicas, pese a que destaca el hecho de que las funciones reveladas en las muestras control y periodontal son muy semejantes, hay diferencias significativas en un pequeño grupo de funciones que se expresan en un grupo mientras que no ocurre lo mismo en el otro.

El análisis de las funciones génicas mediante la aplicación BiNGO® para el programa Cytoscape® muestra una alta expresión de genes/EST relacionados con el metabolismo y las funciones fisiológicas normales de las células, así como con la síntesis de constituyentes intra y extracelulares, seguido de funciones relativas a la diferenciación celular tanto en las muestras sanas como en las de enfermedad periodontal, de lo que se puede deducir que los niveles de queratinización y estructura histológica son normales independientemente del tipo de muestra analizada.

El grupo control muestra una sobreexpresión de genes cuya función es la inhibición de la actividad de la protein quinasa C, la cual está relacionada con la regulación de la producción de metaloproteinasas (MMP) y de inhibidores tisulares de

las metaloproteinasas (TIMP), tal y como se refleja en el trabajos elaborados por Domeij *et al* y Schmitz *et al* (Domeij *et al.*, 2004; Schmitz *et al.*, 1996). Este hecho permite deducir que la mayor expresión de los genes con función inhibidora de la protein quinasa C en el grupo control puede relacionarse con un mayor equilibrio en esta relación entre TIMP y MMP y una mayor estabilidad en los procesos de reabsorción de matriz extracelular, hecho que no se produciría en el caso de las muestras periodontales.

También hay una sobreexpresión de funciones de inhibición de la actividad de endopeptidasas, proteasas, y de serina endopeptidasa.

Las endopeptidasas (también denominadas anteriormente proteinasas, y perteneciente al conjunto de las proteasas), entre cuyo grupo se encuentran las metaloproteinasas, las serinas proteinasas, las cisteína proteinasas (destacando las caspasas) y las aspártico proteinasas (Smith *et al.*, 2000); tienen un papel muy importante en la remodelación de los tejidos y en los procesos inflamatorios degradando las proteínas de la matriz extracelular, promoviendo las reacciones inflamatorias y regulando

- Domeij H, Modéer T, Yucel-Lindberg T. Matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in human gingival fibroblasts: the role of protein kinase C. *J Periodont Res* 2004; 39: 308-314.
- Schmitz JP, Schwartz Z, Sylvia VL, Dean DD, Calderon F, Boyan BD. Vitamin D3 regulation of stromelysin-1 (MMP-3) in chondrocyte cultures is mediated by protein kinase C. *J Cell Physiol* 1996; 168: 570-579.
- Smith AD, Datta SP, Smith GH, Campbell PN, Bentley R, McKenzie HA. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Revised edition. Oxford: Oxford University Press; 2000.

la apoptosis (Sandholm, 1986; Solary *et al.*, 1998). El hecho de que la expresión de los inhibidores de las proteasas y las endopeptidasas esté disminuida en el grupo periodontal explicaría que la actuación de dichas proteasas se produzca de forma descontrolada, provocando la autodestrucción de los tejidos y la evolución de la enfermedad periodontal.

La expresión de genes/EST con función inhibitoria de las serinas endopeptidasas (que junto a las serinas carboxipeptidasas forman las serinas peptidasas, y que pertenecen igualmente al conjunto de las endopeptidasas) se encuentra del mismo modo aumentada en las muestras control frente a las muestras periodontales. Esto es un hecho significativo debido al importante papel que desempeñan dichas serinas endopeptidasas, entre otras funciones, en los procesos de apoptosis de la célula, ya demostrado hace más de 20 años por Ruggiero *et al* (Ruggiero *et al.*, 1987) en cuyo estudio exponía cultivos celulares de células L de roedores, células de carcinoma de cérvix humano y células de melanoma a la acción del factor

de necrosis tumoral a la acción de las serinas endopeptidasas. Así se ponía en evidencia que los inhibidores de las serinas endopeptidasas evitaban y protegían a las células humanas y de roedores de la apoptosis por citotoxicidad mediada por el factor de necrosis tumoral; o por el trabajo de Abate y Schroeder (Abate y Schroeder, 1998), en el cual tras cultivar una determinada línea celular macrofágica de roedor (J774.1A) con lipopolisacáridos de *Escherichia coli* en dos muestras, una junto a inhibidores de serinas endopeptidasas y la otra sin ella, se evidencia que los lipopolisacáridos de *Escherichia coli* causaban la muerte celular mediante una citotoxicidad dependiente de la concentración, y que ésta era inhibida totalmente por la acción de los inhibidores de las serinas endopeptidasas aplicados en la segunda muestra. De forma más reciente, en un estudio sobre células T Jurkat a las que se les induce la apoptosis mediante la aplicación del antibiótico estaurosporina, se ha sugerido que las serinas endopeptidasas son necesarias para la realización de eventos nucleares tales como la condensación, fragmentación y degradación del ADN

- Sandholm L. Proteases and their inhibitors in chronic inflammatory periodontal disease. J Clin Periodontol 1986; 13: 19-26.

- Solary E, Eymin B, Droin N, Haug M. Proteases, proteolysis, and apoptosis. Cell Biol Toxicol 1998; 14: 121-132.

- Ruggiero V, Johnson SE, Baglioni C. Protection from tumor necrosis factor cytotoxicity by protease inhibitors. Cell Immunol 1987; 107: 317-325.

- Abate A, Schröder H. Protease inhibitors protect macrophages from lipopolysaccharide-induced cytotoxicity: possible role for NF-kappaB. Life Sci 1998; 62: 1081-1088.

presentes en los procesos finales de la apoptosis (O'Connell *et al.*, 2006).

De ello, cabría deducir que las células presentes en tejido afectado de enfermedad periodontal no se encuentran protegidas por la acción de inhibidores de la apoptosis, como la de los inhibidores de las serinas endopeptidasas, produciéndose de forma más frecuente el proceso de muerte celular y sucumbiendo prematuramente ante la agresión bacteriana.

Por otro lado, los resultados del análisis con *Microarray* muestran una sobreexpresión de genes/EST con funciones relacionadas con las uniones intercelulares en las muestras control frente a las muestras periodontales, lo que puede indicar la desestructuración que habría presente en la mucosa con alteración periodontal, aumentando los espacios intercelulares, lo que permitiría el paso de bacterias y/o sustancias citotóxicas bacterianas al interior del periodonto, haciendo más difícil la respuesta defensiva del hospedador

y por ende, dificultando el control de la enfermedad periodontal, hechos ya demostrados en las bases de la patogenia de la enfermedad periodontal (AAP, 1999). Estos datos pudieran estar también en relación con una posible menor queratinización y quizás con el hallazgo de patrones de menor grado de diferenciación celular y, por tanto, con uniones intercelulares más laxas en el periodonto de protección de las zonas donde con más facilidad se produce la progresión de la enfermedad periodontal; como demuestran los trabajos de Moreu *et al* (Moreu *et al.*, 1993) y Sánchez-Quevedo *et al* (Sánchez-Quevedo *et al.*, 1994).

Igualmente, no se han obtenido diferencias significativas en relación a funciones génicas relacionadas específicamente con la apoptosis o con la inmunidad, al contrario de lo que sucede en otros artículos como los de Sørensen *et al* (Sørensen *et al.*, 2008), en el cual encuentra 12 funciones sobreexpresadas que están relacionados con la apoptosis, 13 relacionadas con la respuesta inmune

- 
- O'Connell AR, Lee BW, Stenson-Cox C. Caspase-dependant activation of chymotrypsin-like proteases mediates nuclear events during Jurkat T cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 608-616.
  - AAP. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol* 1999; 70: 457-470.
  - Moreu G, Sánchez-Quevedo MC, López-Escámez JA, González-Jaranay M, Campos A. Cell surface patterns in normal human oral gingival epithelium. A quantitative scanning electron microscopy approach. *Histol Histopathol* 1993; 8: 47-50.
  - Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, Campos A, García JM, González-Jaranay M. Regional differences in cell surface patterns in normal human sulcular epithelium.
  - Sørensen LK, Havemose-Poulsen A, Sonder SU, Bendtzen K, Holmstrup P. Blood cell gene expression profiling in subjects with aggressive periodontitis and chronic arthritis. *J Periodontol* 2008; 79: 477-485.



y 6 relacionadas con la actividad de las citoquinas; o el de Demmer *et al* (Demmer *et al.*, 2008), en el cual encuentran al menos 7 funciones génicas relacionadas con la apoptosis y 5 relacionadas con la activación de linfocitos. En concreto, el reciente trabajo de Garzón *et al* (Garzón *et al.*, 2009) revela la sobreexpresión de genes/EST correspondientes con 9 funciones génica relativas al sistema inmune y 10 funciones relacionadas con apoptosis en un reducido número de pacientes; este hecho posiblemente es debido a lo selectivo que se ha sido al determinar unos altos valores de expresión (genes/EST que se expresasen más de 5.000 u.f.) requeridos para considerar los genes como sobreexpresados al analizar las muestras. A este respecto es importante señalar que algunos de los genes que hemos seleccionado en el grupo periodontal podrían actuar, bajo determinadas circunstancias, como genes inhibidores de la apoptosis, como por ejemplo los genes inhibidores de las serinas endopeptidasas (Ruggiero *et al.*, 1987).

Al contrastar los datos de expresión obtenidos en las muestras control y en las periodontales se ha elaborado un algoritmo diagnóstico capaz de relacionar la sobreexpresión de ciertos genes/EST con estado de salud o enfermedad periodontal, con el fin de obtener un método diagnóstico de las muestras. En dicho algoritmo diagnóstico se han incluido los 66 genes/EST que se encuentran solamente en las muestras periodontales o solamente en las muestras control. De estos 66 genes/EST, 45 (68'18%) se encuentran también sobreexpresados en el ya mencionado artículo de Demmer *et al* (Demmer *et al.*, 2008) y, comparado con dicho estudio, 37 de esos 45 genes/EST (87'22%) se encuentran sobreexpresados en el mismo tipo de muestra en ambos casos, mientras que difiere en 8 genes/EST (17'78%). Esta amplia concordancia de genes entre los propuestos en el algoritmo diagnóstico de la presente tesis doctoral y los genes sobreexpresados en el amplio estudio de Demmer, permitirían concluir que los genes

- 
- Demmer RT, Behle JH, Wolf DL, Handfield M, Keschull M, Celenti R, Pavlidis P, Papapanou PN. Transcriptomes in healthy and diseased gingival tissues. *J Periodontol* 2008; 79: 2112-2124.
  - Garzón IJ, Roa A, Nieto R, Moreu G, González-Jaranay M. Enfermedad periodontal y salud humana. Identificación de patrones genéticos, biopatológicos e inmunitarios. *Actual Med* 2009; En prensa.
  - Ruggiero V, Johnson SE, Baglioni C. Protection from tumor necrosis factor cytotoxicity by protease inhibitors. *Cell Immunol* 1987; 107: 317-325.

incluidos en el mismo podrían ser en el futuro una excelente herramienta en el campo del diagnóstico de la enfermedad periodontal.

Tras aplicar el algoritmo sobre una muestra clínicamente diagnosticada como periodontal, el algoritmo clasificó dicha muestra efectivamente como periodontal, mostrando por tanto la validez de dicho algoritmo. Este algoritmo clasificatorio preeliminar

tiene que ser validado y depurado en sucesivos estudios, pero da muestras de la posibilidad de elaboración de una nueva herramienta diagnóstica totalmente objetiva que complementaría a los actuales instrumentos clínicos de identificación de la enfermedad periodontal, y que además colaboraría en el pronóstico y en la actitud terapéutica a tomar ante los pacientes con alteraciones periodontales.



## CONCLUSIONES



**1-** La cuantificación mediante microarrays de oligonucleótidos de la expresión génica de muestras gingivales de pacientes con encía clínicamente sana puso de manifiesto la existencia de 353 genes/EST sobreexpresados, lo cual corresponde al 6'46 ‰ del total de genes/EST analizados. El análisis de las funciones génicas expresadas por la encía clínicamente sana mostró una alta expresión de genes/EST relacionados con el metabolismo y diferentes funciones fisiológicas de la célula normal, así como con la síntesis de constituyentes intra y extracelulares de los tejidos, seguido de funciones relativas a la diferenciación celular.

**2-** La determinación del perfil de expresión génica mediante microarrays de oligonucleótidos en muestras gingivales de pacientes con alteración periodontal puso de manifiesto la existencia de 345 genes/EST sobreexpresados, correspondientes al 6'32 ‰ del total de genes/EST cuantificados. Las funciones génicas correspondientes a estos genes se relacionaron específicamente con fisiología y metabolismo celular, síntesis de organelas y matriz extracelular.

**3-** El análisis de los genes y funciones génicas diferencialmente expresados en los dos grupos de estudio (encía clínicamente sana y

encía de pacientes con alteración periodontal) reveló la existencia de 52 genes/EST cuya expresión fue exclusiva de uno de los dos grupos, representando un 0'95 ‰ del global de genes/EST analizados. Estos datos sugerirían que la patogénesis y la evolución de la alteración periodontal estarían relacionadas principalmente con la expresión de un pequeño y determinado número de genes/EST más que con una diferencia numérica significativa de éstos en salud o enfermedad. En concreto, 30 genes/EST se encontraron sobreexpresados únicamente en las muestras de encía clínicamente sana, destacando un grupo de genes con función inhibitoria de la protein-quinasa C, inhibidores de las endopeptidasas y con funciones relacionadas con las uniones intercelulares. Por el contrario, 22 genes/EST se encontraron sobreexpresados en los pacientes con periodonto alterado, sin que éstos correspondieran a ninguna función relevante. Todo ello podría repercutir en la inestabilidad en los procesos de reabsorción de matriz extracelular, el aumento de los procesos de apoptosis y la posible desestructuración de la mucosa gingival con aumento de espacios intercelulares en los pacientes con periodonto alterado. Todos estos procesos podrían estar relacionados con la génesis y la evolución de la enfermedad periodontal.

4- Los datos de expresión obtenidos en las muestras gingivales sanas y con alteración periodontal permitieron elaborar un algoritmo diagnóstico capaz de relacionar la sobreexpresión de ciertos genes/EST con estado de salud o alteración periodontal, con el fin de obtener un método diagnóstico objetivo de las muestras gingivales. Este algoritmo clasificadorio preliminar debería ser validado y depurado en sucesivos

estudios, pero da muestras de la posibilidad de elaboración de una nueva herramienta diagnóstica totalmente objetiva que complementaría a los actuales instrumentos clínicos de identificación de la enfermedad periodontal, y además, colaboraría en el pronóstico y en la actitud terapéutica a tomar ante los pacientes con alteraciones periodontales.



## BIBLIOGRAFÍA





- AAP. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol* 1999; 70: 457-470.
- AAP. American Academy of Periodontology. Glossary of periodontal terms. 4th edition. Chicago: American Academy of Periodontology; 2001.
- AAP. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol* 2003; 74: 1237-1247.
- AAP. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Epidemiology of periodontal diseases. *J Periodontol* 2005; 76: 1406-1419.
- Abate A, Schröder H. Protease inhibitors protect macrophages from lipopolysaccharide-induced cytotoxicity: possible role for NF-kappaB. *Life Sci* 1998; 62: 1081-1088.
- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International Dental Journal* 1975; 25: 229-235.
- Alaminos M, Mora J, Cheung NK, Smith A, Qin J, Chen L, Gerald WL. Genome-wide analysis of gene expression associated with MYCN in human neuroblastoma. *Cancer Res* 2003; 63: 4538-4546.
- Alaminos M, Gerald WL, Cheung NK. Prognostic value of MYCN and ID2 overexpression in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 45: 909-915.
- Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Andrades M, Fernández-Montoya A, Campos A. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1: 350-359.
- Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, pipe and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol* 2000; 71: 1874-1881.
- Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontology* 2000 2002; 29: 7-10.
- Aldridge JP, Lester V, Watts TL, Collins A, Viberti G, Wilson R. Single-blind studies of the effects of improved periodontal health on metabolic control in type 1 diabetes

- mellitus. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 271-275.
- Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. *J Periodontol* 2003; 74: 1736-1740.
  - Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4: 1-6.
  - Beertsen WB, McCulloch CAG, Sode J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000* 1997; 13: 20-40.
  - Bergström J, Floderus-Myrhed B. Co-twin control study of the relationship between smoking and some periodontal disease factors. *Community Dent Oral Epidemiol* 1983; 11: 113-116.
  - Bergström J, Eliasson S, Dock J. Exposure to tobacco smoking and periodontal health. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 61-68.
  - Bickel M, Axtelius B, Solioz C, Attstrom R. Cytokine gene expression in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 840-847.
  - Bomprezzi R, Ringer M, Kim S. Gene expression profiles in multiple sclerosis patients and healthy controls: Identifying pathways relevant to disease. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2191-2199.
  - Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000* 1997; 13: 41-75.
  - Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 2006; 441: 349-353.
  - Demmer RT, Behle JH, Wolf DL, Handfield M, Keschull M, Celenti R, Pavlidis P, Papananou PN. Transcriptomes in healthy and diseased gingival tissues. *J Periodontol* 2008; 79: 2112-2124.
  - DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M. Use of a cDNA microarray to analyze gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 1996; 14: 457-460.

- Domeij H, Modéer T, Yucel-Lindberg T. Matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in human gingival fibroblasts: the role of protein kinase C. *J Periodont Res* 2004; 39: 308-314.
- Emrich L, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991; 62: 123-131.
- Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol* 1999; 4: 32-37.
- Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* 1999; 26: 112-125.
- Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *BioTechniques* 2000; 29: 1042-1055.
- Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 671-679.
- Garzón IJ, Roa A, Nieto R, Moreu G, González-Jaranay M. Enfermedad periodontal y salud humana. Identificación de patrones genéticos, biopatológicos e inmunitarios. *Actual Med* 2009; En prensa.
- Genc A, Atalay T, Gedikoglu G, Zulfikar B, Kullu S. Leukemic children: clinical and histopathological gingival lesions. *J Clin Pediatr Dent* 1998; 22: 253-256.
- Gómez de Ferraris ME, Campos A. Histología y embriología bucodental. 2ª Edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2004.
- Gümüs ZH, Du B, Kacker A, Boyle JO, Bocker JM, Mukherjee P, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ, Weinstein H. Effects of tobacco smoke on gene expression and cellular pathways in a cellular model of oral leukoplakia. *Cancer Prev Res* 2008; 1: 100-111.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 78-111.
- Haslett JN, Kunkel LM. Microarray analysis of normal and dystrophic skeletal muscle. *Int J Dev Neurosci* 2002; 20: 359-365.
- Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 733-44.

- Honda T, Domon H, Okui T. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol* 2006; 144: 35-40.
- Hugoson A, Norderyd O. Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years? *J Clin Periodontol* 2008; 35: 338-345.
- Jansson L. Association between alcohol consumption and dental health. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 379-384.
- Johnson GK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol 2000* 2007; 44: 178-94.
- Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Isselbacher KJ. *Harrison Principios de medicina interna*. 16ª Edición. México: McGraw-Hill Interamericana; 2006.
- Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000* 2001; 25: 8-20.
- Koshi R, Sugano N, Orii H, Fukuda T, Ito K. Microarray analysis of nicotine-induced changes in gene expression in a macrophage-like human cell line. *J Periodontal Res* 2007 ;42: 518-526.
- Kubota T, Morozumi T, Shimizu K, Sugita N, Kobayashi T, Yoshie H. Differential gene expression in neutrophils from patients with generalized aggressive periodontitis. *J Periodontal Res* 2001; 36: 390-397.
- Kubota T, Itagaki M, Hoshino C, Nagata M, Morozumi T, Kobayashi T, Takagi R, Yoshie H. Altered gene expression levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in periodontitis-affected gingival tissue. *J Periodontol* 2008; 79: 166-173.
- Kung RT, Ochs B, Goodson JM: Temperature as a periodontal diagnostic. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 557-563.
- Li MD, Konu O, Kane JK, Becker KG. Microarray technology and its application on nicotine research. *Mol Neurobiol* 2002; 25 : 265-285.
- Lindhe J, Karring T, Araujo M. The anatomy of periodontal tissues. En: Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Clinical periodontology and implant dentistry*. Volume 1. 5th edition. Oxford: Blackwell Publishing LTD 2008; 3-49.
- Liu CG, Spizzo R, Calin GA, Croce CM. Expression profiling of microRNA using oligo DNA arrays. *Methods* 2008; 44: 22-30.

- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. Molecular genetic techniques and genomics. En: Molecular cell biology, 5th edition. New York: W H Freeman 2003; 351-403.
- Loesche WJ. The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. Oral Microbiol Immunol 1986; 1: 65-72.
- Maere, S., Heymans, K. and Kuiper, M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in biological networks. Bioinformatics 2005; 21: 3448-3449.
- McLachlana JL, Smitha AJ, Bujalska IJ, Cooper PR. Gene expression profiling of pulpal tissue reveals the molecular complexity of dental caries. Biochim Biophys Acta 2005; 1741: 271-281.
- Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000 1994; 5: 66-77.
- Moreu G, Sánchez-Quevedo MC, López-Escámez JA, González-Jaranay M, Campos A. Cell surface patterns in normal human oral gingival epithelium. A quantitative scanning electron microscopy approach. Histol Histopathol 1993; 8: 47-50.
- Nanci A, Bosshardt D. Structure of periodontal tissues in health and disease. Periodontol 2000 2006; 40: 11-28.
- Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. Int J Syst Evol Microbiol 2006; 56: 2135-2146.
- O'Connell AR, Lee BW, Stenson-Cox C. Caspase-dependant activation of chymotrypsin-like proteases mediates nuclear events during Jurkat T cell apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 2006; 345: 608-616.
- Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. Crit Rev Oral Biol Med 1998; 9: 248-266.

- Okamoto Y, Tsuboi S, Suzuki S, Nakagaki H, Ogura Y, Maeda K, Tokudome S. Effects of smoking and drinking habits on the incidence of periodontal disease and tooth loss among Japanese males: a 4-yr longitudinal study. *Journal of Periodontal Research* 2006; 41: 560-566.
- Pääkkönen V, Ohlmeier S, Bergmann U, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Analysis of gene and protein expression in healthy and carious tooth pulp with cDNA microarray and two-dimensional gel electrophoresis. *Eur J Oral Sci* 2005; 113: 369-379.
- Page R, Schroeder H. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 1976; 33: 235-249.
- Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000 1997; 14: 9-11.
- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000 1997; 14: 216-248.
- Patil CS, Kirkwood KL. p38 MAPK signaling in oral-related diseases. *Dent Res* 2007; 86: 812-825.
- Pereira CM, Gasparetto PF, Coracin FL, Marquês JF, Lima CS, Corrêa ME. Severe gingival bleeding in a myelodysplastic patient: management and outcome. *J Periodontol* 2004 Mar; 75: 483-486.
- Perlstein TS, Lee RT. Smoking, metalloproteinases, and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 250-256.
- Pinson M, Hoffman WH, Garnick JJ, Litaker M. Periodontal disease and type I diabetes mellitus in children and adolescents. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 118-23.
- Preber H, Bergström J. Occurrence of gingival bleeding in smoker and non-smoker patients. *Acta Odontol Scand* 1985; 43: 315-320.
- Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med* 2006; 354: 2463-2472.
- Reynolds JJ, Hembry RM, Meikle MC. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. *Adv Dent Res* 1994; 8: 312-319.
- Ruggiero V, Johnson SE, Baglioni C. Protection from tumor necrosis factor cytotoxicity by protease inhibitors. *Cell Immunol* 1987; 107: 317-325.

- Ryder MI, Hyun W, Loomer P, Haqq C. Alteration of gene expression profiles of peripheral mononuclear blood cells by tobacco smoke: implications for periodontal diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 39-49
- Saffar JL, Lasfargues JJ, Cherruau M. Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable. *Periodontol 2000* 1997; 13: 76-90.
- Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52: 841-849.
- Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, Campos A, García JM, González-Jaranay M. Regional differences in cell surface patterns in normal human sulcular epithelium. *Histol Histopathol* 1994; 9: 149-153.
- Sandholm L. Proteases and their inhibitors in chronic inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 19-26.
- Schmitz JP, Schwartz Z, Sylvia VL, Dean DD, Calderon F, Boyan BD. Vitamin D3 regulation of stromelysin-1 (MMP-3) in chondrocyte cultures is mediated by protein kinase C. *J Cell Physiol* 1996; 168: 570-579.
- Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000* 1997; 13: 91-120.
- Smith AD, Datta SP, Smith GH, Campbell PN, Bentley R, McKenzie HA. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Revised edition. Oxford: Oxford University Press; 2000.
- Socransky S, Haffajee A. Evidence of bacterial aetiology: a historical perspective. *Periodontol 2000* 1994; 5: 7-25.
- Socransky S, Haffajee A. Periodontal infections. En: Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Clinical periodontology and implant dentistry*. Volume 1. 5th edition. Oxford: Blackwell Publishing LTD 2008; 207-249.
- Söder P-Ö, Jin LJ, Söder LJ. DNA probe detection of periodontopathogens in advanced periodontitis. *Scand J Dent Res* 1993; 101: 363-370.
- Solary E, Eymin B, Droin N, Haugg M. Proteases, proteolysis, and apoptosis. *Cell Biol Toxicol* 1998; 14: 121-132.

- Sørensen LK, Havemose-Poulsen A, Sønder SU, Bendtzen K, Holmstrup P. Blood cell gene expression profiling in subjects with aggressive periodontitis and chronic arthritis. *J Periodontol* 2008; 79: 477-485.
- Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Diseases* 2004; 10: 311-318.
- Tanner ACR, Maiden MFJ, Zambon JJ, Thoren GS, Kent RL Jr. Rapid chair-side DNA probe assay of *Bacteroides forsythus* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res* 1998; 33: 105-117.
- Tay F, Liu YB, Flynn MJ, Slots J. Evaluation of a non-radioactive DNA probe for detecting *Porphyromonas gingivalis* in subgingival specimens. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 344-348.
- Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. Alcohol consumption and periodontal disease. The third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 484-488.
- Todd R, Wong DT. DNA hybridization arrays for gene expression analysis of human oral cancer. *J Dent Res* 2002; 81: 89-97.
- Tonetti MS. Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. *Ann Periodontol* 1998; 3: 88-101.
- van der Pouw Kraan TC, van Baarsen LG, Rustenburg F, Baltus B, Fero M, Verweij CL. Gene expression profiling in rheumatology. *Methods Mol Med* 2007; 136: 305-327.
- Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Periodontal Res* 2007; 42: 429-437.
- Wang PL, Ohura K, Fujii T, Oido-Mori M, Kowashi Y, Kikuchi M, Suetsugu Y, Tanaka J. DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 970-973.
- Wolf HF, Rateitschak-Pluss EM, Rateitschak KH, Hassell TM. *Color atlas of dental medicine: Periodontology*. 3rd edition. New York: Thieme; 2005.
- Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol* 1996; 1: 879-925.



- Zambon JJ, Haraszthy VI, Hariharan G, Lally ET, Demuth DR. The microbiology of early-onset periodontitis: Association of highly toxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains with localized juvenile periodontitis. J Periodontol 1996; 67: 282-290.



A large, thick, red curved graphic element that starts from the top right corner and curves downwards towards the bottom right corner, partially overlapping the text area.

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTOS DE ESTOMATOLOGÍA E HISTOLOGÍA