

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 157**

21 Número de solicitud: 201730994

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**31.07.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**31.01.2019**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA (100.0%)  
Área de Valorización, Transferencia e  
Emprendemento-Edificio Emprendia  
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**TOMÁS CARMONA, Inmaculada y  
BALSA CASTRO, José Carlos**

74 Agente/Representante:

**CAMIÑA TATO, Montserrat**

54 Título: **CITO-PERIODPREDICTOR**

57 Resumen:

La presente invención se refiere al campo de métodos moleculares de diagnóstico y pronóstico para patologías. En concreto, se refiere a un procedimiento diagnóstico/pronóstico basado en modelos predictivos multivariantes generados a partir de los niveles de distintas combinaciones de citoquinas proinflamatorias (IL1alfa, IL1beta e IL17A) y anti-inflamatorias (IFNgamma, IL2, IL12p70, IL3, IL4, IL5, IL10 e IL3) en tejido o fluidos orales para el diagnóstico de las enfermedades periodontales, su progresión y su respuesta a las diferentes intervenciones terapéuticas. En un ejemplo particular, estas combinaciones de citoquinas mostraron una excelente capacidad de discriminar ( $\geq 95\%$ ) la presencia de una periodontitis crónica con respecto a una situación de salud gingival/periodontal, así como porcentajes de precisión  $\geq 92\%$  en la mayoría de las combinaciones.

ES 2 698 157 A1

**DESCRIPCIÓN****CITO-PERIODPREDICTOR****SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere al campo de métodos moleculares de diagnóstico y pronóstico para patologías. En concreto, la invención se refiere al uso de técnicas de modelado predictivo multivariante para el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades periodontales.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

10 Las enfermedades periodontales se encuentran entre las condiciones más comunes que afectan a los seres humanos (Dentino A et al, 2013). Las patologías periodontales incluyen a la gingivitis (que llega a afectar prácticamente a toda la población en algún momento de su vida) (Offenbacher S et al, 2008) y a varios tipos de periodontitis (crónica y agresiva) (Henderson B et al, 2009). En 2010, se estimó que la periodontitis representaba la sexta enfermedad más prevalente a nivel mundial, afectando a 743 millones de personas y con una incidencia estandarizada por edad de 701 casos por 100.000 habitantes/año (Kassebaum N et al, 2014). En el reciente “11th European Workshop on Periodontology”, los expertos confirmaron que la prevalencia de las periodontitis en Europa continuaba siendo muy elevada, afectando a más del 50% de los adultos, y en sus formas severas, al 11% de este grupo poblacional (Tonetti M et al, 2015).

20 Las enfermedades periodontales no son un problema silente. Los pacientes que sufren estas patologías manifiestan una peor percepción de su estado de salud oral y una peor calidad de vida en relación con los sujetos que no padecen estas patologías, representando la práctica de un tratamiento periodontal una mejora significativa de las percepciones sobre salud oral y calidad de vida de estos pacientes (Al-Harathi L et al, 2013; Shanbhag S et al, 2012). Por otro lado, en la actualidad, las enfermedades periodontales han adquirido una gran importancia en el ámbito de la salud general, ya que existe una evidencia científica sólida que sustenta la relación bidireccional de estas patologías orales con la patogénesis de varias condiciones sistémicas, tales como diabetes (Chapple ILC et al, 2013), enfermedad cardíaca coronaria (Tonetti M et al, 2013), artritis reumatoide (de Pablo P et al, 2009), enfermedades respiratorias (Bansal M et al, 2013) y enfermedad de Alzheimer (Abbayya K et al, 2015).

35 En el ámbito odontológico, determinadas medidas clínicas son utilizadas para evaluar la severidad de las enfermedades periodontales y la respuesta a las diferentes terapias, y éstas incluyen: los niveles de placa bacteriana, el grado de inflamación gingival, la profundidad de las bolsas periodontales, el nivel de inserción clínica y la pérdida ósea radiográfica (Korte DL et al, 2016). Sin embargo, estos criterios clínicos tradicionales asociados a un alto grado de subjetividad e imprecisión no son útiles para determinar la actividad de las enfermedades periodontales o el riesgo futuro de pérdida ósea (Zhang L et al, 2009; Giannobile WV et al, 2009). Como consecuencia, uno de los principales desafíos pendientes en el campo de la periodoncia, es el desarrollo de tests diagnósticos/pronósticos basados en biomarcadores con constatada sensibilidad y especificidad para predecir la susceptibilidad a las enfermedades periodontales desde sus fases iniciales, y evaluar la actividad de la patología y la eficacia de las distintas terapias aplicadas (Zhang L et al, 2009; Buduneli N et al, 2011). The ‘Biomarkers Definitions Working Group’ define “biomarcador” como una característica que puede ser cuantificada y evaluada de forma objetiva, y que representa un indicador de un proceso biológico, de un proceso patológico o de una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica (Biomarkers Definitions Working Group, 2001).

50 La principal característica clínica de la gingivitis es la presencia de sangrado gingival, y de la periodontitis es la destrucción de los tejidos periodontales, ambas características son consecuencia de una inflamación aguda (presente en la gingivitis) y crónica (presente en las periodontitis) provocada por una respuesta inmunológica del hospedador a la presencia de una disbiosis polimicrobiana (Yucel-Lindberg T & Bage T, 2013; Darveau RP, 2010). Esta respuesta inmunológica se caracteriza por: 1) la infiltración de células inmunitarias (neutrófilos, monocitos/macrófagos y linfocitos) a los tejidos gingivales; y 2) la producción de elevadas concentraciones de mediadores, incluyendo citoquinas, quimiocinas, metabolitos del ácido araquidónico y enzimas proteolíticas (Yucel-Lindberg T & Bage T, 2013; Preshaw PM & Taylor JJ, 2011).

55 La naturaleza y la severidad de esta respuesta inmunológica del hospedador son factores fundamentales en la susceptibilidad y progresión de las enfermedades periodontales (Jaedicke KM et al, 2016).

60 Para el estudio de biomarcadores asociados a las enfermedades periodontales se utilizan dos fluidos orales: el fluido crevicular gingival (FCG) y la saliva. El análisis de estos dos fluidos aporta una mejor representación de los cambios patológicos locales acontecidos en la cavidad oral asociados a las

enfermedades periodontales con respecto a los hallazgos obtenidos en muestras séricas (Jaedicke KM et al, 2016). El FCG es un exudado del suero originado en el plexo gingival de los vasos sanguíneos del tejido conectivo gingival, cerca del revestimiento epitelial del espacio dentogingival (surco gingival). Los niveles de este fluido en el surco gingival se incrementan significativamente con la severidad de la inflamación periodontal y su consistencia se transforma en un exudado inflamatorio a medida que atraviesa los tejidos gingivales inflamados, recogiendo moléculas bacterianas y del hospedador (Griffiths GS, 2003; Champagne CME et al, 2003). Por lo tanto, el FCG es una muestra que refleja con elevada precisión el conjunto de mediadores inflamatorios y de reabsorción ósea asociados a la patogénesis de las enfermedades periodontales y su obtención representa un método no invasivo (Champagne CME et al, 2003). Por su parte, la saliva está considerada “el espejo del cuerpo”, procede de las secreciones exocrinas de las glándulas salivales y contiene FCG, componentes bacterianos y del hospedador, así como restos alimenticios. La saliva se trata de una muestra de fácil recogida, que no precisa de complejas destrezas clínicas y que se puede obtener en volúmenes elevados (Jaedicke KM et al, 2016).

Con el desarrollo de las técnicas de inmunoanálisis (en adelante, ELISA), la interleuquina (en adelante, IL) 1beta fue la primera citoquina que se cuantificó en los tejidos gingivales de pacientes con periodontitis crónica (Hönig J et al, 1989). Desde ese momento, numerosos autores han investigado los niveles de citoquinas en el FCG y en la saliva, confirmando que existe un perfil distintivo de algunos de estos mediadores inflamatorios en los pacientes con enfermedades periodontales (Buduneli N et al, 2011; Boronat-Catalá M et al, 2014; Stadler AF et al, 2016) e incluso, la presencia de un perfil distintivo entre distintos grados de severidad de estas patologías (Stadler AF et al, 2016). Como ejemplo, Stadler et al (Stadler et al, 2016) en su estudio de meta-análisis pusieron de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre la periodontitis crónica y la salud periodontal en las citoquinas pro-inflamatorias, IL1beta, IL6 y IL17, las cuales presentaron niveles más elevados en la enfermedad con respecto a la salud; y en las citoquinas anti-inflamatorias, interferón gamma (en adelante, IFNgamma) e IL4, las cuales presentaron niveles más elevados en la salud con respecto a la enfermedad. También hay estudios en la literatura en los que se han detectado un incremento en la expresión de los genes de determinadas citoquinas, como los de la IL1, IL6 o IL8, en los pacientes con periodontitis (Zorina OA et al, 2016; Kobayashi T et al, 2016; Braosi AP et al 2012).

Por otro lado, el hábito tabáquico está considerado un factor de riesgo en el desarrollo de las enfermedades periodontales (Genco RJ & Borgnakke WS, 2013; Johannesen A et al, 2014), por lo que algunos autores han observado la influencia de este hábito en los niveles de mediadores inflamatorios en las muestras orales de pacientes periodontales (Tymkiw KD et al, 2011; Toker H et al, 2012). Específicamente, en estos estudios, los autores demostraron el posible efecto inmunosupresor del tabaco en las enfermedades periodontales, ya que los pacientes periodontales fumadores presentaron concentraciones inferiores de determinadas citoquinas pro-inflamatorias, como IL1alfa, IL1beta, IL6 e IL12 (p40), con respecto a las detectadas en los pacientes periodontales no fumadores (Tymkiw KD et al, 2011; Toker H et al, 2012).

En relación con el posible valor pronóstico de los biomarcadores inflamatorios en la progresión de las enfermedades periodontales, en algunos estudios se han observado que la práctica de un tratamiento periodontal provoca una alteración significativa de los niveles de las citoquinas presentes en el FCG y en la saliva de pacientes con enfermedades periodontales (Stadler AF et al, 2016; Jaedicke KM et al, 2016). Sin embargo, es importante destacar que son pocas las citoquinas en las que se ha podido apreciar esta alteración de sus niveles después de la práctica de un tratamiento periodontal. Así, en el FCG, se demostró que la práctica de un tratamiento periodontal provocaba un descenso de los niveles de IL1beta e IL17, mientras que un incremento de IL4 (Stadler AF et al, 2016); por el contrario, en la saliva, solo se ha podido constatar un efecto de reducción en las concentraciones de IL1beta (Jaedicke KM et al, 2016). Sin embargo, la mayoría de los trabajos de la literatura se centran en estudiar sólo determinadas citoquinas pro-inflamatorias, tales como la IL1beta o el factor de necrosis tumoral alfa (en adelante, TNFalfa) (Nazar Majeed Z et al, 2016) o los resultados son contradictorios sobre cuales citoquinas, especialmente las anti-inflamatorias, son las más implicadas en la patogénesis y evolución de las enfermedades periodontales debido a la ausencia absoluta de uniformidad en los diseños metodológicos de los estudios (Stadler AF et al, 2016). Además, en la mayoría de los estudios se realizaron la determinación simultánea en los fluidos orales de muy pocas citoquinas (menos de 5 citoquinas), lo cual dista mucho de reflejar la compleja respuesta inflamatoria descrita en las enfermedades periodontales (Thunell DH et al, 2010; Tymkiw KD et al, 2011; Shimada et al, 2013). Por ello, no hay suficiente evidencia sobre el análisis de un espectro amplio de biomarcadores inflamatorios que reflejen con precisión la compleja realidad inmunológica asociada a estas patologías.

Por otra parte, como se ha descrito con anterioridad, en la mayoría de los estudios publicados en la literatura, los autores se limitan a realizar un análisis comparativo de los niveles de las citoquinas entre

diferentes grupos de pacientes (controles sanos *versus* pacientes periodontales; pacientes periodontales no tratados *versus* pacientes periodontales tratados, etc.). Este tipo de análisis únicamente pone de manifiesto la relación entre los biomarcadores evaluados y la condición biológica, pero en absoluto demuestra su posible capacidad predictiva o discriminatoria de dicha condición biológica.

5

Consecuentemente, no hay evidencia sobre el desarrollo y validación de modelos predictivos basados en los niveles de citoquinas para el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades periodontales aplicando adecuadas técnicas de modelado predictivo multivariante (Moons KGM et al, 2015); representando éste un paso fundamental en la creación de kits diagnóstico/pronóstico de las enfermedades periodontales.

10

La principal diferencia de la presente propuesta con respecto lo publicado hasta el momento, radica en el desarrollo de numerosos modelos predictivos basados en diferentes combinaciones de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, que, mediante adecuadas técnicas de modelado predictivo multivariante, mostraron una excelente capacidad predictiva y discriminatoria de las enfermedades periodontales. Esta excelente capacidad predictiva se sustenta en porcentajes de discriminación de la condición clínica de periodontitis con respecto a salud periodontal >95%, así como porcentajes de precisión  $\geq 92\%$  en la mayoría de las combinaciones. Esta capacidad predictiva es superior a la aportada hasta el momento con otros biomarcadores con distintas funciones biológicas, la cual no alcanza el 70%. Estos modelos predictivos representarían diferentes opciones de kits diagnóstico/pronóstico de las enfermedades periodontales basados en distintas combinaciones de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

20

### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

25

La invención se refiere a un procedimiento diagnóstico/pronóstico basado en modelos predictivos multivariantes generados a partir de los niveles de distintas combinaciones de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en tejido gingival, FCG y saliva para la predicción de las enfermedades periodontales, su progresión y su respuesta a las diferentes intervenciones terapéuticas. A este respecto, los inventores han mostrado que, inesperadamente, mediante técnicas de modelado predictivo multivariante determinadas citoquinas pro-inflamatorias (IL1alfa, IL1beta, IL17A) combinadas con una serie de anti-inflamatorias (IFNgamma, IL2, IL12p70, IL3, IL4, IL5, IL10 e IL3) muestran una excelente capacidad predictiva de las enfermedades periodontales, con porcentajes de discriminación >95%, porcentajes de precisión  $\geq 92\%$ , así como porcentajes de sensibilidad y especificidad  $\geq 90\%$  en la mayoría de las combinaciones.

30

35

Por tanto, esto permite el uso de distintos modelos predictivos multivariantes basados en combinaciones de citoquinas (pro-inflamatorias y anti-inflamatorias) y ajustados por el "hábito tabáquico", no solo como un método diagnóstico de las enfermedades periodontales, sino también como método para predecir el pronóstico futuro de estas enfermedades así como la progresión clínica de las mismas cuando un sujeto se acoge a una determinada actitud o recibe una determinada intervención terapéutica.

40

Basándose en estos hallazgos los inventores han desarrollado los métodos de la presente invención en sus diferentes realizaciones que se describen a continuación en detalle.

### **PRIMER MÉTODO. MÉTODO IN VITRO PARA DIAGNOSTICAR UNA ENFERMEDAD PERIODONTAL EN UN SUJETO**

45

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método in vitro para diagnosticar una enfermedad periodontal en un sujeto, a continuación, en el presente documento, "el primer método de la invención", que comprende:

50

a) Determinar el nivel de expresión en un sujeto de, al menos, dos citoquinas seleccionadas entre las siguientes: IL1alfa, IL1beta, IL17A, IFNgamma, IL2, IL12p70, IL3, IL4, IL5, IL10 e IL3 en una muestra de dicho sujeto.

b) Determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador en dicho sujeto.

55

c) Obtener un valor de probabilidad asociado al nivel de expresión de las citoquinas, a través de modelos predictivos multivariantes, que refiere la probabilidad de padecer una enfermedad periodontal. Cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe una mayor certeza en el diagnóstico de una enfermedad periodontal. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de padecer o no una enfermedad periodontal. Este valor de probabilidad es obtenido bien mediante el uso de software específico para la lectura de la prueba que aporta este valor de probabilidad o bien mediante la aportación de dicha información de probabilidad al usuario en cualquier formato, incluyendo las formas oral, escrita, gráfica o electrónica para que la

60

compare con los valores que ha obtenido.

El término “diagnóstico” tal como se usa en el presente documento, se refiere tanto al proceso de intentar determinar y/o identificar una posible enfermedad en un sujeto, es decir el procedimiento de diagnóstico, como a la opinión a la que se llega mediante este proceso, es decir la opinión de diagnóstico. Como tal, también puede considerarse como un intento de clasificación del estado de un individuo en categorías independientes y diferenciadas que permiten tomar decisiones médicas sobre el tratamiento y el pronóstico. Como entenderá el experto en la técnica, un diagnóstico de este tipo puede no ser correcto para el 100% de los sujetos que han de diagnosticarse, aunque se prefiere. Sin embargo, el término requiere que pueda identificarse una proporción estadísticamente significativa de sujetos que padecen tales patologías (en este caso, enfermedad periodontal).

Puede determinarse si un sujeto es estadísticamente significativo sin más preámbulos por un experto en la técnica usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas como, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de valor p, índice de clasificación con validación cruzada y similares, etc.

El término “enfermedad periodontal” tal como se usa en el presente documento, se refiere tanto a las enfermedades gingivales como a las enfermedades periodontales de tipo destructivo, abarcando a numerosas entidades clínicas que afectan a las estructuras gingivales y periodontales de los dientes en la cavidad oral. Dentro de las enfermedades gingivales se diferencian:

- Enfermedades gingivales inducidas por placa dental: Gingivitis inducida por placa (sin otros factores locales contribuyentes); Gingivitis inducida por placa con factores locales contribuyentes; Gingivitis ulcerativa necrotizante; Gingivitis asociada a la pubertad; Gingivitis asociada al ciclo menstrual; Gingivitis asociada al embarazo; Granuloma piógeno asociado al embarazo; Gingivitis asociada a diabetes mellitus; Gingivitis asociada a leucemia; Hiperplasia gingival inducida por fármacos; Gingivitis asociada a los anticonceptivos orales; Gingivitis por déficit de ácido ascórbico. Lesiones gingivales no inducidas por placa: Lesiones asociadas a *Neisseria gonorrhoea*; Lesiones asociadas a *Treponema Pallidum*; Lesiones asociadas a estreptococos; Lesiones asociadas a *Mycobacterium Tuberculosis*; Angiomatosis bacilar; Gingivostomatitis herpética primaria; Herpes oral recurrente; Infecciones por varicela-zoster; Candidiasis gingival generalizada; Eritema lineal gingival; Histoplasmosis; Fibromatosis gingival hereditaria.
- Manifestaciones gingivales de: Liquen plano; Penfigoide de las mucosas; Pénfigo vulgar; Eritema multiforme; Lupus eritematoso; Dermatitis de IgA lineal; Granulomatosis de Wegener; Psoriasis.
- Reacciones alérgicas de la encía: Materiales restauradores (mercurio, níquel, acrílico); Pastas dentífricas; Colutorios; Aditivos de los chicles o goma de mascar; Alimentos y aditivos alimentarios; Lesiones traumáticas de la encía; Lesiones químicas; Lesiones físicas; Lesiones térmicas.

Dentro de las enfermedades periodontales de tipo destructivo se diferencian:

- Periodontitis crónica (localizada/generalizada).
- Periodontitis agresiva (localizada/generalizada).
- Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas: asociada a trastornos hematológicos; Neutropenia adquirida; Leucemias; Asociada a trastornos genéticos; Neutropenia cíclica y familiar; Síndrome de Down; Síndromes de deficiencia en la adhesión leucocitaria; Síndrome de Papillon-Lefèvre; Síndrome de Chediak-Higashi; Enfermedad de las células de Langerhans (síndromes de histiocitosis); Enfermedad por almacenamiento de glucógeno; Enfermedad granulomatosa crónica; Agranulocitosis genética infantil; Síndrome de Cohen; Síndrome de Ehler-Danlos (tipos IV y VIII); Hipofosfatasa; Enfermedad de Crohn (enfermedad inflamatoria intestinal); Síndrome de Marfan.
- Periodontitis ulcerativa necrosante.
- Abscesos del periodonto.
- Periodontitis apical. En una realización particular, el primer método de la invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad periodontal, en el que la enfermedad periodontal se selecciona del grupo que consiste en gingivitis, periodontitis crónica o periodontitis agresiva. También se incluye el término salud gingival/periodontal.

El término “gingivitis”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una enfermedad inflamatoria de la gingiva que rodea a los dientes, de carácter reversible, que se caracteriza por la presencia de inflamación gingival y sangrado.

El término “periodontitis crónica”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una enfermedad inflamatoria del periodonto que rodea a los dientes, que se caracteriza por la presencia de

inflamación gingival y sangrado, la pérdida de adherencia con la formación de bolsa periodontal y la reducción del hueso alveolar.

5 El término “periodontitis agresiva”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una forma de periodontitis de progresión rápida y gran capacidad destructiva del hueso alveolar.

10 El término de “salud gingival/periodontal”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una ausencia absoluta de enfermedad inflamatoria y procesos destructivos de los tejidos gingivales y periodontales.

10 La primera etapa del primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión en un sujeto de, al menos, dos citoquinas seleccionadas entre las siguientes: IL1alfa, IL1beta, IL17A, IFNgamma, IL2, IL12p70, IL3, IL4, IL5, IL10 e IL3 en una muestra de dicho sujeto.

15 El término “IL1alfa” o “interleuquina 1alfa” tal como se presenta en este documento, se refiere a una proteína que en seres humanos está codificada por el gen IL1A (símbolo oficial de la base de datos NCBI Gene). El gen IL1A también se ha designado como “interleukin 1 alpha” (nombre completo oficial de la base de datos NCBI Gene). IL-1alfa es una citoquina pro-inflamatoria y desempeña un papel en el sistema inmunitario. En particular, la secuencia de la proteína IL1alfa humana se proporciona en la entrada Gene ID 3552 de la base de datos del NCBI Gene con anotación actualizada de 4 de junio de 2017.

25 El término “IL1beta” o “interleuquina 1beta” tal como se presenta en este documento, se refiere a una proteína que en seres humanos está codificada por el gen IL1B (símbolo oficial de la base de datos NCBI Gene). El gen IL1B también se ha designado como “interleukin 1 beta” (nombre completo oficial de la base de datos NCBI Gene). IL-1beta es una citoquina pro-inflamatoria y desempeña un papel en el sistema inmunitario. En particular, la secuencia de la proteína IL1beta humana se proporciona en la entrada Gene ID 3553 de la base de datos del NCBI Gene con anotación actualizada de 2 de julio de 2017.

30 El término “IL17A” o “interleuquina 17A” tal como se presenta en este documento, se refiere a una proteína que en seres humanos está codificada por el gen IL17A (símbolo oficial de la base de datos NCBI Gene). El gen IL17A también se ha designado como “interleukin 17A” (nombre completo oficial de la base de datos NCBI Gene). IL17A es una citoquina pro-inflamatoria y desempeña un papel en el sistema inmunitario. En particular, la secuencia de la proteína IL17A humana se proporciona en la entrada Gene ID 3605 de la base de datos del NCBI Gene con anotación actualizada de 2 de julio de 2017.

40 El término “IFNgamma” o “interferón gamma” tal como se presenta en este documento, se refiere a una proteína que en seres humanos está codificada por el gen IFNG (símbolo oficial de la base de datos NCBI Gene). El gen IFNG también se ha designado como “interferon gamma” (nombre completo oficial de la base de datos NCBI Gene). IFNgamma es una citoquina anti-inflamatoria y desempeña un papel en el sistema inmunitario. En particular, la secuencia de la proteína IFNgamma humana se proporciona en la entrada Gene ID 3458 de la base de datos del NCBI Gene con anotación actualizada de 1 de julio de 2017.

45 El término “IL2” o “interleuquina 2” tal como se presenta en este documento, se refiere a una proteína que en seres humanos está codificada por el gen IL2 (símbolo oficial de la base de datos NCBI Gene). El gen IL2 también se ha designado como “interleukin 2” (nombre completo oficial de la base de datos NCBI Gene). IL-2 es una citoquina anti-inflamatoria y desempeña un papel en el sistema inmunitario. En particular, la secuencia de la proteína IL-2 humana se proporciona en la entrada Gene ID 3558 de la base de datos del NCBI Gene con anotación actualizada de 2 de julio de 2017.

55 El término “IL12p70” o “interleuquina 12p70” tal como se presenta en este documento, se refiere a se refiere a una subunidad obtenida a partir de la combinación de la subunidad p35 y la subunidad p40 de una proteína que en seres humanos está codificada por el gen IL12B (símbolo oficial de la base de datos NCBI Gene). El gen IL12B también se ha designado como “interleukin 12B” (nombre completo oficial de la base de datos NCBI Gene). IL12p70 es una citoquina anti-inflamatoria y desempeña un papel en el sistema inmunitario. En particular, la secuencia de la proteína IL12p70 humana se proporciona en la entrada Gene ID 3593 de la base de datos del NCBI Gene con anotación actualizada de 6 de junio de 2017.

60 El término “IL3” o “interleuquina 3” tal como se presenta en este documento, se refiere a una proteína que en seres humanos está codificada por el gen IL3 (símbolo oficial de la base de datos NCBI Gene). El gen

- IL3 también se ha designado como “interleukin 3” (nombre completo oficial de la base de datos NCBI Gene). IL3 es una citoquina anti-inflamatoria y desempeña un papel en el sistema inmunitario. En particular, la secuencia de la proteína IL3 humana se proporciona en la entrada Gene ID 3562 de la base de datos del NCBI Gene con anotación actualizada de 8 de junio de 2017.
- 5 El término “IL4” o “interleuquina 4” tal como se presenta en este documento, se refiere a una proteína que en seres humanos está codificada por el gen IL4 (símbolo oficial de la base de datos NCBI Gene). El gen IL4 también se ha designado como “interleukin 4” (nombre completo oficial de la base de datos NCBI Gene). IL4 es una citoquina anti-inflamatoria y desempeña un papel en el sistema inmunitario. En particular, la secuencia de la proteína IL4 humana se proporciona en la entrada Gene ID 3565 de la base de datos del NCBI Gene con anotación actualizada de 25 de junio de 2017.
- 10 El término “IL5” o “interleuquina 5” tal como se presenta en este documento, se refiere a una proteína que en seres humanos está codificada por el gen IL5 (símbolo oficial de la base de datos NCBI Gene). El gen IL5 también se ha designado como “interleukin 5” (nombre completo oficial de la base de datos NCBI Gene). IL5 es una citoquina anti-inflamatoria y desempeña un papel en el sistema inmunitario. En particular, la secuencia de la proteína IL5 humana se proporciona en la entrada Gene ID 3567 de la base de datos del NCBI Gene con anotación actualizada de 4 de junio de 2017.
- 15 El término “IL10” o “interleuquina 10” tal como se presenta en este documento, se refiere a una proteína que en seres humanos está codificada por el gen IL10 (símbolo oficial de la base de datos NCBI Gene). El gen IL10 también se ha designado como “interleukin 10” (nombre completo oficial de la base de datos NCBI Gene). IL10 es una citoquina anti-inflamatoria y desempeña un papel en el sistema inmunitario. En particular, la secuencia de la proteína IL10 humana se proporciona en la entrada Gene ID 3586 de la base de datos del NCBI Gene con anotación actualizada de 2 de julio de 2017.
- 20 El término “IL13” o “interleuquina 13” tal como se presenta en este documento, se refiere a una proteína que en seres humanos está codificada por el gen IL13 (símbolo oficial de la base de datos NCBI Gene). El gen IL13 también se ha designado como interleukin 13 (nombre completo oficial de la base de datos NCBI Gene). IL13 es una citoquina anti-inflamatoria y desempeña un papel en el sistema inmunitario. En particular, la secuencia de la proteína IL13 humana se proporciona en la entrada Gene ID 3596 de la base de datos del NCBI Gene con anotación actualizada de 11 de junio de 2017.
- 30 El término “sujeto” tal y como se presenta en este documento, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no se restringe a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el paciente es un ser humano de sexo masculino o femenino de cualquier edad o raza.
- 35 El término “muestra” o “muestra biológica” tal y como se presenta en este documento significa material biológico aislado de la boca de un sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para detectar el biomarcador deseado. En una realización preferida, la muestra es una muestra oral de tejido, FCG o saliva. La muestra puede aislarse usando cualquier método convencional conocido en la técnica. En resumen, puede obtenerse muestras de tejido gingival mediante incisión de 1 mm de tejido, muestras de FCG mediante puntas de papel superabsorbentes colocadas en el surco gingival o el empleo de micropipetas y muestras de saliva no estimulada o estimulada mediante mecanismos externos.
- 40 En una realización preferida, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de las citoquinas IL1beta + IL12p70 en una muestra del sujeto que va a diagnosticarse.
- 45 En otra realización preferida, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL1beta + IL2 en una muestra del sujeto que va a diagnosticarse.
- 50 En otra realización preferida, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL1beta + IFNgamma en una muestra del sujeto que va a diagnosticarse.
- 55 En otra realización preferida, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL1alfa + IFNgamma en una muestra del sujeto que va a diagnosticarse.
- 60 En otra realización preferida, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL1alfa + IL13 en una muestra del sujeto que va a diagnosticarse.
- En otra realización preferida, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL1alfa + IL12p70 en una muestra del sujeto que va a diagnosticarse.
- En otra realización preferida, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL17A + IL3 en una muestra del sujeto que va a diagnosticarse.

En otra realización preferida, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL17A + IL12p70 una muestra del sujeto que va a diagnosticarse

En otra realización preferida, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL17A + IFNgamma una muestra del sujeto que va a diagnosticarse.

5

Tal como se usa en el presente documento, el término “nivel de expresión” se refiere al valor de un parámetro que mide el grado de expresión de un gen específico o del polipéptido correspondiente. En una realización particular, dicho valor puede determinarse midiendo el nivel de ARNm del gen de interés o de un fragmento del mismo o midiendo la cantidad de proteína codificada por dicho gen de interés o una variante del mismo. Por tanto, en el contexto de la presente invención, en una realización particular, dicho nivel de expresión comprende determinar el nivel de ARNm codificado por los genes de cualquiera de las combinaciones de dos citoquinas mencionadas anteriormente o determinar los niveles de proteínas de cualquiera de las combinaciones de dos citoquinas mencionadas anteriormente.

10

15

Puede usarse cualquier método convencional para detectar y cuantificar el nivel de expresión de un gen específico dentro del marco de la presente invención. A modo de ilustración no limitativa, el nivel de expresión de un gen puede determinarse por medio de cuantificación del nivel de ARNm de dicho gen o por medio de cuantificación del nivel de proteína codificada por dicho gen. Se conocen diversos métodos para determinar la cantidad de ARNm en el estado de la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en la muestra, tal como la muestra procedente del sujeto de estudio, se extrae según métodos convencionales, por ejemplo, por medio del uso de enzimas líticas, disoluciones químicas o resinas fijadoras. El ARNm extraído puede detectarse mediante hibridación (por ejemplo, por medio de análisis de transferencia de tipo Northern o alineamientos de ADN o ARN (microalineamientos) tras convertir el ARNm en ADNc marcado) y/o amplificación por medio de una reacción en cadena enzimática. En general, se prefieren métodos de amplificación enzimáticos cuantitativos o semicuantitativos. La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o en tiempo real cuantitativa (RT-PCR) o semicuantitativa es particularmente ventajosa. Otros métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) y amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA). La cantidad de ARNm se mide preferiblemente de forma cuantitativa o semicuantitativa.

20

25

30

La determinación de la cantidad de proteína correspondiente a la expresión de un gen específico también puede realizarse usando cualquier método convencional para la detección y cuantificación de proteínas, por ejemplo, utilizando inmunoensayo, etc. A modo de ilustración no limitativa, dicha determinación puede realizarse usando anticuerpos con la capacidad de unirse específicamente a la proteína que va a determinarse (o fragmentos de la misma con los determinantes antigénicos) y la posterior cuantificación de los derivados del complejo antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, etc. Dichos anticuerpos pueden marcarse o no con un marcador. Entre los ensayos que pueden utilizarse para la determinación están, por ejemplo, Western, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo) EIA (inmunoensayo enzimático), etc.

35

40

En una realización particular, la determinación del nivel de expresión de las citoquinas puede realizarse mediante citometría de flujo. En resumen, la citometría de flujo es una tecnología basada en el láser que permite el análisis simultáneo de las características físicas y químicas de hasta miles de partículas por segundo. Se basa en el uso de fluoróforos que se unen a un anticuerpo que reconocen una diana concreta en las células.

45

50

La segunda etapa del primer método de la invención comprende determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador del sujeto. El término “fumador”, tal y como se presenta en este documento, es alguien que bien fuma todos los días, por lo menos un cigarrillo (fumador diario) o que fuma en la actualidad, pero no todos los días, menos de un cigarrillo al día (fumador ocasional o no diario) en los últimos 6 meses. El término “no fumador”, tal y como se presenta en este documento, es la persona que nunca ha fumado o ha fumado menos de 100 cigarrillos en toda su vida. El término “exfumador”, tal y como se presenta en este documento, es la persona que habiendo sido fumador se ha mantenido en abstinencia al menos por los últimos 6 meses.

55

La determinación de la condición de fumador, no fumador o exfumador se realiza mediante un cuestionario estructurado y/o mediante la cuantificación objetiva, aplicando técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución, de componentes del tabaco en la cavidad oral.

60

La tercera etapa del primer método de la invención comprende obtener un valor de probabilidad, mediante un modelo predictivo multivariante, asociado al nivel de expresión de las citoquinas obtenido en el

- apartado a), que refiere la probabilidad de padecer una enfermedad periodontal, obtenido bien mediante el uso de software específico para la lectura de la prueba que aporte este valor de probabilidad o bien mediante la presentación de dicha información presentada en cualquier formato, incluyendo las formas oral, escrita, gráfica o electrónica. Cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe una mayor certeza en el diagnóstico de una enfermedad periodontal. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de padecer o no una enfermedad periodontal.
- 5 El término “valor de probabilidad” tal como se usa en el presente documento, se refiere a una medida de la certidumbre asociada a un suceso o evento futuro y suele expresarse como un número entre 0 y 1 (o entre 0% y 100%). El valor de probabilidad se obtiene mediante el desarrollo de un modelo matemático.
- 10 En una realización particular del primer método de la invención, se tiene como objetivo diagnosticar una enfermedad periodontal utilizando los niveles de expresión de determinadas combinaciones de citoquinas pro-inflamatorias con citoquinas anti-inflamatorias.
- 15 En otra realización preferida del primer método de la invención, se tiene como objetivo diagnosticar que un paciente padece gingivitis, en cuyo caso cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe mayor certeza en el diagnóstico de una gingivitis. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de padecer o no una gingivitis.
- 20 En otra realización preferida del primer método de la invención, se tiene como objetivo diagnosticar que un paciente padece periodontitis crónica en cuyo caso cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe mayor certeza en el diagnóstico de una periodontitis crónica. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de padecer o no una periodontitis crónica.
- 25 En otra realización preferida del primer método de la invención, se tiene como objetivo diagnosticar que un paciente padece periodontitis agresiva, en cuyo caso cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe mayor certeza en el diagnóstico de una periodontitis agresiva. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de padecer o no una periodontitis agresiva.
- 30 SEGUNDO MÉTODO. MÉTODO PARA DETERMINAR EL RIESGO DE DESARROLLAR UNA ENFERMEDAD PERIODONTAL EN UN SUJETO
- En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método in vitro para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad periodontal en un sujeto, en adelante “el segundo método de la invención” que comprende:
- 35 a) Determinar el nivel de expresión de, al menos, dos citoquinas seleccionadas entre las siguientes: IL1alfa, IL1beta, IL17A, IFN gamma, IL-2, IL12p70, IL-3, IL4, IL5, IL10 e IL13 en una muestra de dicho sujeto.
- 40 b) Determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador en dicho sujeto.
- c) Obtener un valor de probabilidad asociado al nivel de expresión de las citoquinas, a través de modelos predictivos multivariantes, que refiere la probabilidad de riesgo de padecer en un futuro una enfermedad periodontal. Cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe un mayor riesgo de padecer una futura enfermedad periodontal. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de padecer o no la futura enfermedad periodontal. Este valor de probabilidad es obtenido bien mediante el uso de software específico para la lectura de la prueba que aporta este valor de probabilidad o bien mediante la aportación de dicha información de probabilidad al usuario en cualquier formato, incluyendo las formas oral, escrita, gráfica o electrónica para que la compare con los valores que ha obtenido.
- 45 La expresión “determinar el riesgo” o “predicción del riesgo”, o similar, tal y como se utiliza en el presente documento es sinónimo de la expresión “evaluar el riesgo” o “evaluación del riesgo” significa que la presente invención hace que sea posible predecir, estimar o evaluar el riesgo de que un sujeto desarrolle una futura enfermedad periodontal detectable clínicamente. La predicción del riesgo implica generalmente que el riesgo o bien aumenta o bien se reduce. Tal y como se entenderá por los expertos en la técnica, la predicción o el riesgo, aunque se prefiere que se corrija, no es necesario que se haga para el 100% de los pacientes que padecen enfermedades periodontales que van a evaluarse. Sin embargo, el término requiere que pueda identificarse una parte estadísticamente significativa de los sujetos que tienen una probabilidad aumentada de tener una futura enfermedad periodontal.
- 50 Los términos “sujeto”, “muestra” y “enfermedad periodontal” se han definido previamente en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables en el segundo método de la invención.
- 60

- En una realización particular, la muestra de dicho sujeto se obtiene de tejido y fluidos orales. Se han detallado métodos para obtener muestras de tejido y fluidos orales en el primer método de la invención.
- 5 En otra realización particular, la enfermedad periodontal se selecciona de “gingivitis” y “periodontitis crónica” o “periodontitis agresiva” que se han definido previamente.
- 10 La primera etapa del segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión en un sujeto de al menos dos citoquinas seleccionadas entre las siguientes: IL1alfa, IL1beta, IL17A, IFNgamma, IL2, IL12p70, IL3, IL4, IL5, IL10 e IL3 en una muestra de dicho sujeto. Estos términos se han definido previamente en el primer método de la invención.
- 15 En una realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de las citoquinas IL1beta + IL12p70 en una muestra del sujeto en el que se va a determinar el riesgo futuro.
- En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL1beta + IL2 en una muestra del sujeto en el que se va a determinar el riesgo futuro.
- 20 En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL1beta + IFNgamma en una muestra del sujeto en el que se va a determinar el riesgo futuro.
- En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL1alfa + IFNgamma en una muestra del sujeto en el que se va a determinar el riesgo futuro.
- 25 En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL1alfa + IL13 en una muestra del sujeto en el que se va a determinar el riesgo futuro.
- En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL1alfa + IL12p70 en una muestra del sujeto en el que se va a determinar el riesgo futuro.
- 30 En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL17A + IL3 en una muestra del sujeto en el que se va a determinar el riesgo futuro.
- En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL17A + IL12p70 en una muestra del sujeto en el que se va a determinar el riesgo futuro.
- En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL17A + IFNgamma en una muestra del sujeto en el que se va a determinar el riesgo futuro.
- 35 Los niveles de expresión de las citoquinas se han definido previamente. En una realización particular, dicho nivel de expresión comprende determinar el nivel de ARNm codificado por los genes de cualquiera de las combinaciones de dos citoquinas mencionadas anteriormente o determinar los niveles de proteínas de cualquiera de las combinaciones de dos citoquinas mencionadas anteriormente.
- 40 Se han detallado métodos para determinar los niveles de expresión de IL1alfa, IL1beta, IL17A, IFNgamma, IL2, IL12p70, IL3, IL4, IL5, IL10 e IL3 en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables al segundo método de la invención.
- La segunda etapa del segundo método de la invención comprende determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador del sujeto. Estos términos se han definido previamente en el contexto del primer método de la invención.
- 45 La tercera etapa del segundo método de la invención comprende obtener un valor de probabilidad, mediante un modelo predictivo multivariante, asociado al nivel de expresión de las citoquinas obtenido en el apartado c) de riesgo de desarrollar en un futuro una enfermedad periodontal. En cuyo caso cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe mayor riesgo de desarrollar en un futuro una enfermedad periodontal. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de riesgo de padecer o no la futura enfermedad periodontal. El término “valor de probabilidad” se ha definido previamente en el contexto del primer método de la invención.
- 50
- 55 En una realización particular, el segundo método de la invención tiene como objetivo determinar el riesgo de desarrollar en el futuro una gingivitis en un sujeto al que se le ha diagnosticado clínicamente de forma previa un estado de salud gingival/periodontal.
- En una realización particular, el segundo método de la invención tiene como objetivo determinar el riesgo de desarrollar una periodontitis en un sujeto al que se le ha diagnosticado clínicamente de forma previa un estado de salud gingival/periodontal.
- 60

TERCER MÉTODO. MÉTODO PARA DETERMINAR LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE UN SUJETO QUE PADECE UNA ENFERMEDAD PERIODONTAL

- 5 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método in vitro para determinar la respuesta al tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad periodontal, a continuación, en el presente documento “el tercer método de la invención” que comprende:
- 10 a) Determinar el nivel de expresión de, al menos, dos citoquinas seleccionadas entre las siguientes: IL1alfa, IL1beta, IL17A, IFN gamma, IL2, IL12p70, IL3, IL4, IL5, IL10 E IL13 en una muestra de dicho sujeto;
- 10 b) Determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador en dicho sujeto.
- Obtener un valor de probabilidad asociado al nivel de expresión de las citoquinas, a través de modelos predictivos multivariantes, que refiere la probabilidad de una peor respuesta a un determinado tratamiento clínico en un paciente con enfermedad periodontal en cuyo caso cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe peor respuesta a un determinado tratamiento clínico. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de respuesta negativa o positiva a un determinado tratamiento clínico. Este valor de probabilidad es obtenido bien mediante el uso de software específico para la lectura de la prueba que aporta este valor de probabilidad o bien mediante la aportación de dicha información de probabilidad al usuario en cualquier formato, incluyendo las formas oral, escrita, gráfica o electrónica para que la compare con los valores que ha obtenido.
- 15 El término “determinar la respuesta” o “predecir la respuesta” se usa en el presente documento para referirse a la posibilidad de que un paciente tenga una respuesta clínica particular, ya sea positiva o negativa. Los métodos predictivos de la presente invención pueden usarse clínicamente para tomar decisiones de tratamiento mediante la elección de las modalidades de tratamiento más apropiadas para cualquier paciente particular. Los métodos predictivos de la presente invención son herramientas valiosas en la predicción de si es probable que un paciente responda favorablemente o desfavorablemente a un régimen de tratamiento con una terapia.
- 20 El término “terapia” tal y como se presenta en este documento, se refiere a un protocolo de actuación para el tratamiento de una enfermedad periodontal, el cual implica la utilización de fármacos y agentes antimicrobianos y la práctica de determinadas maniobras.
- 30 Tal como entenderán los expertos en la técnica, la predicción, aunque se prefiere que se corrija, no es necesariamente que se haga para el 100% de los sujetos que van a evaluarse. Sin embargo, el término requiere que pueda identificarse que una parte estadísticamente significativa de sujetos tienen una probabilidad aumentada de tener un desenlace dado.
- 35 Los términos “sujeto”, “muestra” y “enfermedad periodontal” se han definido previamente en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables en el tercer método de la invención.
- 40 En una realización particular, la muestra de dicho sujeto se obtiene de tejido y fluidos orales. Se han detallado métodos para obtener muestras de tejido y fluidos orales en el primer método de la invención.
- En otra realización particular, la enfermedad periodontal se selecciona de “gingivitis” y “periodontitis crónica” o “periodontitis agresiva” que se han definido previamente.
- 45 La primera etapa del segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión en un sujeto de al menos dos citoquinas seleccionadas entre las siguientes: IL1alfa, IL1beta, IL17A, IFNgamma, IL2, IL12p70, IL3, IL4, IL5, IL10 e IL3 en una muestra de dicho sujeto. Estos términos se han definido previamente en el primer método de la invención.
- 50 En una realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de las citoquinas IL1beta + IL12p70 en una muestra del sujeto en el que se va a determinar la respuesta a un tratamiento.
- En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL1beta + IL2 en una muestra del sujeto en el que se va a determinar la respuesta a un tratamiento.
- 55 En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL1beta + IFNgamma en una muestra del sujeto en el que se va a determinar la respuesta a un tratamiento.
- En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL1alfa + IFNgamma en una muestra del sujeto en el que se va a determinar la respuesta a un tratamiento.
- 60 En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL1alfa + IL13 en una muestra del sujeto en el que se va a determinar la respuesta a un tratamiento.

- En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL17A + IL12p70 una muestra del sujeto en el que se va a determinar la respuesta a un tratamiento.
- 5 En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL17A + IL3 una muestra del sujeto en el que se va a determinar la respuesta a un tratamiento.
- En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL17A + IL12p70 una muestra del sujeto en el que se va a determinar la respuesta a un tratamiento.
- 10 En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de IL17A + IFN $\gamma$  una muestra del sujeto en el que se va a determinar la respuesta a un tratamiento.
- 15 Los niveles de expresión de las citoquinas se han definido previamente. En una realización particular, dicho nivel de expresión comprende determinar el nivel de ARNm codificado por los genes de cualquiera de las combinaciones de dos citoquinas mencionadas anteriormente o determinar los niveles de proteínas de cualquiera de las combinaciones de dos citoquinas mencionadas anteriormente
- Se han detallado métodos para determinar los niveles de expresión de IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL17A, IFN $\gamma$ , IL2, IL12p70, IL3, IL4, IL5, IL10 e IL3 en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables al tercer método de la invención.
- 20 La segunda etapa del tercer método de la invención comprende determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador del sujeto. Los términos "fumador", "no fumador" o "exfumador" se han definido previamente en el contexto del primer método de la invención.
- 25 La tercera etapa del segundo método de la invención comprende obtener un valor de probabilidad, mediante un modelo predictivo multivariante, asociado al nivel de expresión de las citoquinas obtenido en el apartado b), que refiere la probabilidad de una peor respuesta a un determinado tratamiento clínico de un paciente con enfermedad periodontal en cuyo caso cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe
- 30 peor respuesta a un determinado tratamiento clínico. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de respuesta negativa o positiva a un determinado tratamiento clínico. El término "valor de probabilidad" se ha definido previamente en el contexto del primer método de la invención.
- 35 Una vez se realizan las tres etapas del método, el tercer método de la invención permite tomar decisiones de tratamiento mediante la elección de la modalidad de tratamiento más apropiada para cualquier paciente con enfermedad periodontal.

#### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 40 **Figura 1.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1 $\alpha$  y "hábito tabáquico".
- Figura 2.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1 $\beta$  y "hábito tabáquico".
- Figura 3.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL17A y "hábito tabáquico".
- Figura 4.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1 $\alpha$ , IFN $\gamma$  y "hábito tabáquico".
- 45 **Figura 5.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1 $\alpha$ , IL2 y "hábito tabáquico".
- Figura 6.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1 $\alpha$ , IL3 y "hábito tabáquico".
- Figura 7.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1 $\alpha$ , IL4 y "hábito tabáquico".
- Figura 8.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1 $\alpha$ , IL5 y "hábito tabáquico".
- Figura 9.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1 $\alpha$ , IL10 y "hábito tabáquico".
- 50 **Figura 10.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1 $\alpha$ , IL12p70 y "hábito tabáquico".
- Figura 11.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1 $\alpha$ , IL13 y "hábito tabáquico".

- Figura 12.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1beta, IFNgamma y “hábito tabáquico”.
- Figura 13.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1beta, IL2 y “hábito tabáquico”.
- Figura 14.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1beta, IL3 y “hábito tabáquico”.
- 5 **Figura 15.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1beta, IL4 y “hábito tabáquico”.
- Figura 16.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1beta, IL5 y “hábito tabáquico”.
- Figura 17.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1beta, IL10 y “hábito tabáquico”.
- Figura 18.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1beta, IL12p70 y “hábito tabáquico”.
- 10 **Figura 19.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1beta, IL3 y “hábito tabáquico”.
- Figura 20.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL17A, IFNgamma y “hábito tabáquico”.
- Figura 21.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL17A, IL2 y “hábito tabáquico”.
- Figura 22.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL17A, IL3 y “hábito tabáquico”.
- 15 **Figura 23.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL17A, IL4 y “hábito tabáquico”.
- Figura 24.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL17A, IL5 y “hábito tabáquico”.
- Figura 25.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL17A, IL10 y “hábito tabáquico”.
- Figura 26.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL17A, IL12p70 y “hábito tabáquico”.
- Figura 27.** Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL17A, IL13 y “hábito tabáquico”.

20 **MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se ilustra adecuadamente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretender ser limitativos de su alcance.

25 **Ejemplo 1. Pacientes y sujetos control**

Se seleccionó una muestra de conveniencia de 150 participantes, de los cuales 75 fueron controles con salud periodontal (grupo control) y 75 pacientes con periodontitis crónica generalizada moderada-severa (grupo perio). Estos participantes se seleccionaron de un grupo de 250 sujetos de la población general que acudieron a la Facultad de Medicina y Odontología (Universidade de Santiago de Compostela) para una evaluación de su estado de salud oral entre los años 2013-2015.

30 Los criterios de exclusión fueron: (i) historia médica de enfermedad o infección cardiovascular, cerebrovascular, renal o hepática, diabetes mellitus o enfermedades transmisibles (ii) embarazo o lactancia, (iii) toma de antibióticos sistémicos en los 6 meses previos o de antiinflamatorios en las 4 semanas anteriores, (iv) uso rutinario de antisépticos orales. v) presencia de implantes o aparatos ortodóncicos; vi) antecedentes de tratamiento periodontal previo; vii) condición de exfumador de menos de 5 años; y viii) presencia de como mínimo 18 dientes naturales.

35 Un odontólogo experimentado y previamente calibrado efectuó todos los diagnósticos periodontales. Las mediciones clínicas se realizaron en todas las piezas dentarias y en seis zonas por diente usando una sonda PCP-UNC 15 e incluyeron: profundidad de sondaje periodontal (en adelante, PPD) y pérdida de inserción clínica (en adelante, CAL =PPD + recesión gingival). También se registró el índice de sangrado al sondaje (en adelante, BOP) y el índice de placa bacteriana (en adelante, BPL) en la boca completa y en seis zonas por diente aplicando una escala binaria (presencia/ausencia). En cada paciente, se efectuó una serie radiográfica periapical con la finalidad de evaluar el estado del hueso alveolar.

40 El diagnóstico de periodontitis crónica se basó en la información clínica y radiográfica obtenida. El grupo control incluyó a pacientes con salud periodontal que presentaron BOP <25%, ninguna localización con PSP ≥4 mm ni evidencia radiográfica de pérdida ósea alveolar. El grupo perio incluyó a pacientes que fueron diagnosticados de padecer periodontitis crónica generalizada moderada-severa aplicando criterios

clínicos previamente establecidos (Armitage GC, 1999; Page RC & Eke PI, 2007). También se evaluó el hábito tabáquico mediante la aplicación de un cuestionario, recogiendo información sobre el estado del hábito (no fumador, exfumador, fumador actual), tiempo transcurrido como “exfumador”, tiempo transcurrido como “fumador”, y número de cigarrillos al día.

- 5 Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki (revisada en 2000) sobre estudios en experimentación humana (World Medical Association, 2013). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigaciones Clínicas de Galicia (número de registro 2015/006). Se aplicaron las directrices TRIPOD para el desarrollo de técnicas de modelado predictivo diagnóstico/pronóstico de carácter multivariante (Moons KGM et al, 2015).
- 10 **Ejemplo 2. Análisis estadístico: Comparación de las características clínicas entre los dos grupos de estudio (controles con salud periodontal y pacientes con periodontitis crónica)**

- 15 Para detectar diferencias en las características clínicas entre los dos grupos de estudio se efectuó un análisis univariante. El tipo de distribución de las variables cuantitativas se evaluó mediante el test Shapiro-Wilk, obteniéndose ausencia de normalidad en todos los casos. Por consiguiente, para comparar características clínicas de carácter cuantitativo (edad, número de dientes, parámetros clínicos de BPL, BOP, PPD y CAL en boca completa y en las localizaciones muestreadas) entre ambos grupos de estudio se aplicó el test de la U de Mann-Whitney. Para analizar la asociación de variables clínicas de carácter cualitativo (género y hábito tabáquico) entre ambos grupos de estudio se aplicó el test exacto de Fisher. Se estableció un nivel de significación de  $P < 0,05$ .

20 **Ejemplo 3. Resultados: Características clínicas de los pacientes de los grupos de estudio**

- 25 De los 150 participantes iniciales, hubo 3 sujetos (1 del grupo control y 2 del grupo perio) que fueron excluidos por motivos inesperados, por lo que finalmente se evaluaron 147 sujetos con una edad de  $48,37 \pm 11,55$  años (62 hombres y 85 mujeres). De los 147 participantes, 74 fueron del grupo control y 73 del grupo perio. La edad media de los pacientes del grupo control fue significativamente inferior a la detectada en los del grupo perio ( $45,65 \pm 12,37$  y  $51,12 \pm 10,01$  años, respectivamente;  $P = 0,005$ ). En relación con el hábito tabáquico, el número de pacientes fumadores fue significativamente mayor en el grupo perio con respecto al control (41 y 13 pacientes, respectivamente;  $P < 0,001$ ). El análisis de las variables clínicas asociadas al estado de salud oral demostró que, en comparación con el grupo control, los pacientes del grupo perio presentaron valores significativamente superiores de BPL, BOP, PPD y CAL tanto en la boca completa como en las zonas orales seleccionadas para la obtención de las muestras de FCG ( $P < 0,001$ ; Tabla 1).

**Tabla 1.** Edad, género, hábito tabáquico y características clínicas asociadas con el estado periodontal en los pacientes de ambos grupos de estudio (control y perio). Los valores expresados son medias (desviaciones típicas) y número de sujetos.

PARÁMETROS CLÍNICOS	GRUPOS DE ESTUDIO		
	Grupo Control (n= 74)	Grupo Perio (n= 73)	Valor P
<b>Edad (años)</b>	45,65 (12,37)	51,12 (10,01)	0,005
<b>Género</b>			
Varones	31	31	NS
Mujeres	43	42	
<b>Hábito tabáquico<sup>1</sup></b>			
No fumadores	61	32	<0,001
Fumadores	13	41	
Cigarrillos/día (número)	8,08 (4,44)	15,20 (7,94)	0,001
Meses fumando (número)	236,38 (155,91)	320,78 (109,03)	NS
<b>Número de dientes</b>	26,72 (3,25)	25,55 (4,00)	NS

PARÁMETROS CLÍNICOS	GRUPOS DE ESTUDIO		
	Grupo Control (n= 74)	Grupo Perio (n= 73)	Valor P
<b>Boca completa</b>			
BPL (%)	26,41 (18,66)	53,08 (26,77)	<0,001
BOP (%)	15,05 (6,61)	51,12 (20,07)	<0,001
PPD (mm)	2,11 (0,27)	3,49 (0,65)	<0,001
CAL (mm)	2,36 (0,46)	4,25 (1,12)	<0,001
<b>Localizaciones muestreadas</b>			
BOP (%)	10,11 (10,24)	66,97 (23,93)	<0,001
PPD (mm)	2,23 (0,22)	5,65 (0,89)	<0,001
CAL (mm)	2,31 (0,27)	6,05 (1,12)	<0,001

BPL= índice de placa bacteriana; BOP= índice de sangrado al sondaje; PPD= profundidad de sondaje periodontal; CAL= pérdida de inserción clínica; NS= no significativo. 1-Pacientes fueron definidos como fumadores si ellos fumaban en la actualidad y presentaban un historial tabáquico de como mínimo 8 años; pacientes fueron definidos como no fumadores si ellos nunca habían fumado o habían dejado el hábito hacia más de 5 años.

#### Ejemplo 4. Metodología: Recogida de las muestras orales de fluido gingival crevicular

De cada paciente se recogió muestras de FCG una semana después de efectuar la exploración intraoral. Estas muestras se obtuvieron siempre en el mismo momento del día (por la tarde, aproximadamente a las 5-7 horas después del último cepillado). Antes de la obtención de la muestra, las piezas dentarias se aislaron con rollos de algodón, la placa supragingival se removió de forma cuidadosa y la localización seleccionada fue secada ligeramente con la jeringa de aire. A continuación, una tira de papel superabsorbente (Periopaper, Amityville, NY, USA) se insertó en el surco gingival o bolsa periodontal durante 30 segundos. En los casos de contaminación con sangre, las tiras de papel se desecharon y nuevas localizaciones fueron muestreadas.

En los pacientes del grupo control, las muestras de FCG se recogieron de 20 localizaciones subgingivales de los dientes de los cuadrantes 1 y 3 (incisivo, canino, primer premolar, segundo premolar y molar) y se mezclaron en un mismo tubo. En los pacientes del grupo perio, las muestras de FCG se recogieron de las localizaciones subgingivales con mayor PPD en cada cuadrante (un total de 20 localizaciones subgingivales no adyacentes) y se mezclaron en un mismo tubo. Las 20 tiras de papel de cada paciente se colocaron en tubos correctamente etiquetados que contenían: 300 ml de 0,01M PBS con un pH de 7,2 y un inhibidor de proteasas (Complete Mini, protease inhibitor cocktail tablets, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Para prevenir pérdidas por evaporación, los volúmenes de FCG se determinaron mediante mediciones inmediatas del peso de los tubos y de las tiras de papel antes y después de la recogida de las muestras usando una balanza de alta precisión (Griffiths GS, 2003). Después de una agitación de 20 min, las tiras de papel se extrajeron y las muestras se centrifugaron durante 5 min a 5800 g con la finalidad de descartar el pellet celular. Las muestras de FCG se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis bioquímico.

#### Ejemplo 5. Metodología: Cuantificación de los niveles de citoquinas en el fluido crevicular gingival usando un inmunoensayo multiplexado

Un único investigador cegado a los datos clínicos de los pacientes realizó el análisis de cuantificación de citoquinas en las muestras de FCG. Esta cuantificación se efectuó usando un plex de 16 citoquinas Procarta immunoassay (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA), y los mediadores evaluados fueron: 1) ocho citoquinas pro-inflamatorias (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos –GMCSF-, IL1alfa, IL1beta, IL6, IL12p40, IL17A, IL17F y TNFalfa); y 2) ocho citoquinas anti-inflamatorias (IFNgamma, IL2, IL3, IL4, IL5, IL10, IL12p70 e IL13).

Los inmunoensayos se realizaron en placas de filtro de 96 pocillos siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas de filtro se humedecieron con una solución tampón de lavado y dicha solución se aspiró de los pocillos usando un bloque separador magnético manual (Millipore Corporation, Billerica, MA). A los pocillos se añadieron las microesferas revestidas con los anticuerpos monoclonales a los 16 analitos diana. Los patrones y las muestras se inyectaron en los pocillos y se incubaron durante la noche a 4°C. Después se lavaron los pocillos, utilizando de nuevo un bloque separador magnético manual (Millipore Corporation), y se añadió una mezcla de anticuerpos secundarios biotinilados.

Después de la incubación durante 30 min, a las microesferas se añadió estreptavidina conjugada a la proteína fluorescente R-ficoeritrina (estreptavidina-RPE) y se incubó durante 30 min. Después de un lavado para eliminar los reactivos no unidos, se añadió un tampón de lectura (Affymetrix, Inc) a los pocillos y se analizaron las microesferas (mínimo de 100 por analito) utilizando el instrumento Luminex 100TM (Luminex Corporation, Austin, Texas, EE. UU.). Todas las muestras se realizaron por duplicado.

El Luminex 100™ analizó las propiedades espectrales de las microesferas para distinguir los diferentes analitos mientras que simultáneamente midió la cantidad de fluorescencia asociada con R-ficoeritrina, determinando la intensidad de fluorescencia mediana (MFI). Las concentraciones de los diferentes analitos (antígenos en las muestras de GCF) fueron: 1) estimadas a partir de sus respectivas curvas estándar utilizando un algoritmo 5PL y el software Luminex IS 2.3 y xPONENT 3.1 (Luminex Software, Inc.); y 2) ajustadas por el factor de dilución y expresadas como pg/ml. Los rangos de concentración para cada biomarcador analizado fueron: GMCSF, 0,53-55,050 pg/ml; IFNgamma, 0,02-6,650 pg/ml; IL1alfa, 0,34-28,800 pg/ml; IL1beta, 0,09-23,150 pg/ml; IL2, 0,04-13,700 pg/ml; IL3, 0,19-26,500 pg/ml; IL4, 0,10-29,250 pg/ml; IL5, 0,04-17,800 pg/ml; IL6, 0,10-27,200 pg/ml; IL10, 0,04-10,050 pg/ml; IL12p40, 0,14-27,350 pg/ml; IL12p70, 0,26-18,050 pg/ml; IL13, 0,34-23,700 pg/ml; IL17A, 0,36-30,900 pg/ml; IL17F, 0,25-34,700 pg/ml; y TNFalfa, 0,21-16,800 pg/ml. Las muestras de FCG que mostraron valores de analitos por debajo del límite de detección (LD) del ensayo se registraron como LD/2 (Uh HW et al, 2008), mientras que a las muestras con valores por encima del límite superior de cuantificación de las curvas estándar se les asignó el valor más alto de la curva.

#### 20 **Ejemplo 6. Análisis estadístico: Comparación de los niveles de citoquinas en el fluido crevicular gingival entre controles con salud periodontal y pacientes con periodontitis crónica. Asociación de los niveles de citoquinas en el fluido crevicular gingival y la presencia de periodontitis crónica**

Después de la aplicación del test de Shapiro-Wilk, y debido a que las concentraciones de las citoquinas presentaron distribuciones no normales, estos valores se transformaron en valores logarítmicos (log2). A pesar del efecto de la transformación logarítmica, las concentraciones de la mayoría de las citoquinas continuaron mostrando una distribución no normal.

Los datos cuantitativos sobre los niveles de citoquinas en el GCF se expresaron como medianas y rangos intercuartiles. Se aplicó el test de U de Mann-Whitney para comparar los niveles de citoquinas entre el grupo control y el grupo perio. Se realizó una regresión logística binaria con cada variable para estudiar la asociación de cada citoquina con la presencia de periodontitis crónica. Se calcularon los odds ratio no ajustados (ORna) y los odds ratios ajustados (ORa) en relación con las covariables de edad, género (el sexo masculino se estableció como referencia) y el tabaquismo (se estableció el estatus "no fumador" como referencia). Se calcularon los intervalos de confianza (IC) del 95% para ambos OR y los valores de *P*. El nivel de significación aplicado fue *P* < 0,05.

#### 35 **Ejemplo 7. Resultados: Comparación de los niveles de citoquinas en el fluido crevicular gingival entre controles con salud periodontal y pacientes con periodontitis crónica. Asociación de los niveles de citoquinas en el fluido crevicular gingival y la presencia de periodontitis crónica**

Los niveles de todas las citoquinas pro-inflamatorias (GMCSF, IL1alpha, IL1beta, IL6, IL12p40, IL17A, IL17F y TNFalfa) fueron significativamente superiores en el grupo perio comparado con el grupo control (*P* < 0,001, para todas las comparaciones). En cuanto a las citoquinas anti-inflamatorias, sólo cuatro mediadores (IFNgamma, IL2, IL3 e IL4) presentaron concentraciones significativamente superiores en el grupo perio (*P* < 0,001, para todas las comparaciones; Tabla 2).

Los niveles de todas las citoquinas pro-inflamatorias (GMCSF, IL1alfa, IL1beta, IL6, IL12p40, IL17A, IL17F y TNFalfa) mostraron asociaciones positivas significativas con la presencia de periodontitis crónica (rango OR = 1,371-25,638). IL1alfa presentó el valor OR más alto (25,368; IC 95% = 9,472-104,246) seguida de ILbeta (OR = 9,474, IC 95% = 5,049-21,662), IL17A (OR = 6,946, IC 95% = 3,920-14,342). La IL12p40 (OR = 4,307, IC 95% = 2,697-7,451). Respecto a las citoquinas anti-inflamatorias, sólo cuatro mediadores presentaron asociaciones positivas significativas con la presencia de periodontitis crónica, siendo esta asociación más débil que la detectada en las citocinas pro-inflamatorias (rango OR = 1,413-1,735). IL2 mostró que el valor OR más alto (1,735; IC 95% = 1,241-2,549) seguida de IL3 (OR = 1,719; IC 95% = 1,302-2,377) (Tabla 2).

Cuando los OR se ajustaron por edad, género y hábito tabáquico, observamos que estos valores se modificaron ligeramente (menos 20%), por lo que no se consideró como evidencia de confusión (Sanders AE et al, 2009).

**Tabla 2.** Concentraciones ( $\log_2$  pg/ml) de las 16 citoquinas en ambos grupos de estudio (U Mann-Whitney, valores *P*) y odds ratios estimados (intervalos de confianza al 95%, valores *P*) de los modelos no ajustados por el “hábito tabáquico”.

Citoquina	Concentración ( $\log_2$ pg/ml) Mediana (RIQ)		Valor <i>P</i> (U Mann- Whitney)	OR	IC 95%		Valor <i>P</i> (OR)
	Grupo Control	Grupo Perio			Inferior	Superior	
GMCSF	7,244 (1,214)	7,954 (1,485)	<0,001	2,284	1,543	3,523	<0,001
IL1alfa	14,931 (0,889)	17,183 (1,665)	<0,001	25,638	9,472	104,246	<0,001
IL1beta	11,500 (0,996)	14,132 (1,357)	<0,001	9,474	5,049	21,662	<0,001
IL6	7,285 (1,956)	8,296 (2,002)	<0,001	1,719	1,369	2,253	<0,001
IL12p40	3,120 (0,970)	4,173 (0,927)	<0,001	4,307	2,697	7,451	<0,001
IL17A	3,006 (2,029)	4,867 (1,277)	<0,001	6,946	3,920	14,342	<0,001
IL17F	2,046 (1,525)	3,373 (1,710)	<0,001	2,207	1,644	3,064	<0,001
TNFalfa	2,862 (1,697)	4,554 (0,979)	<0,001	1,371	1,125	1,700	0,002
IFNgamma	2,417 (1,185)	3,363 (1,395)	<0,001	1,463	1,171	1,872	0,001
IL2	3,424 (1,133)	3,973 (0,702)	<0,001	1,735	1,241	2,549	0,002
IL3	5,607 (1,071)	6,649 (1,880)	<0,001	1,719	1,302	2,377	<0,001
IL4	2,745 (2,449)	3,713 (2,584)	<0,001	1,413	1,162	1,742	<0,001
IL5	3,219 (1,301)	3,625 (0,836)	0,495	1,030	0,789	1,349	NS
IL10	2,640 (1,577)	3,101 (2,080)	0,087	1,136	0,919	1,415	NS
IL12p70	3,174 (3,053)	3,864 (1,976)	0,352	1,079	0,896	1,304	NS
IL13	4,904 (2,881)	5,066 (3,514)	0,458	1,009	0,872	1,169	NS

5 RIQ, rango intercuartílico; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza; FCG, fluido crevicular gingival; NS= no significativo.

10 Rango de concentraciones para cada citoquina analizada: GMCSF, 0,53-55.050 pg/ml; IFNgamma, 0,02-6.650 pg/ml; IL1alpha, 0,34-28.800 pg/ml; IL1beta, 0,09-23.150 pg/ml; IL2, 0,04-13.700 pg/ml; IL3, 0,19-26.500 pg/ml; IL4, 0,10-29.250 pg/ml; IL5, 0,04-17.800 pg/ml; IL6, 0,10-27.200 pg/ml; IL10, 0,04-10.050 pg/ml; IL12p40, 0,14-27.350 pg/ml; IL12p70, 0,26-18.050 pg/ml; IL13, 0,34-23.700 pg/ml; IL17A, 0,36-30.900 pg/ml; IL17F, 0,25-34.700 pg/ml; TNFalfa, 0,21-16.800 pg/ml.

**Ejemplo 8. Análisis estadístico: Modelización multivariante de los niveles de citoquinas en el fluido crevicular gingival con capacidad predictiva: selección de modelos y validación interna**

15 Se calcularon las correlaciones de Spearman entre las citoquinas y se utilizaron como una orientación para la construcción de modelos, con el fin de evitar redundancias y posible colinealidad entre citoquinas con efectos biológicos similares. Los modelos basados en los niveles de citoquinas en el fluido crevicular gingival fueron seleccionados por su significación biológica, su capacidad para predecir la periodontitis crónica y su validez estadística. Los criterios biológicos aplicados para seleccionar las citoquinas predictoras se sustentaron en su nivel de importancia en el proceso inflamatorio, y en particular, en el  
20 diferente papel etiopatogénico que ejercen las citoquinas pro-inflamatorias con respecto a las anti-inflamatorias.

Los modelos se construyeron seleccionando inicialmente una citoquina pro-inflamatoria como variable predictora. Con la finalidad de comprobar si la capacidad predictiva de las citoquinas pro-inflamatorias podía incrementarse por la incorporación de citoquinas con efectos anti-inflamatorios, se analizaron modelos de dos variables que combinaron estos diferentes mediadores. Los modelos resultantes se ajustaron individualmente en relación con el "estado de tabaquismo" (se estableció la condición de "no fumador" como referencia).

El criterio estadístico aplicado para la selección del modelo basado en los niveles de citoquinas en el fluido crevicular gingival fue su capacidad para discriminar la presencia de periodontitis crónica, que se evaluó mediante la curva ROC ("Receiver Operating Characteristic") aplicando el paquete Epi (Carstensen B et al, 2016). Esta curva es una representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad para un sistema clasificador binario según se varía el umbral de discriminación del respectivo modelo. El área bajo la curva (en adelante, ABC), que es el estadístico C, se consideró como un índice para determinar la capacidad discriminativa del modelo y proporciona una escala de 0,5 a 1,0 (con 0,5 representando probabilidad aleatoria y 1,0 indicando discriminación perfecta), con el cual comparar la capacidad de un biomarcador para detectar un resultado positivo (Steyerberg EW et al, 2010). Señalar que los modelos con un valor de ABC igual o superior a 0,70 son considerados modelos predictivos aceptables (Hosmer DW et al, 2013). El cálculo de los valores de ABC y sus correspondientes valores de 95 % CIs se realizaron mediante técnicas bootstrap utilizando el paquete pROC (Robin X et al, 2011). Se seleccionaron aquellos modelos de una citoquina que presentaban los valores de ABC más altos.

De los modelos basados en citoquinas seleccionados, utilizando el paquete pROC y el método bootstrap, se obtuvieron numerosas medidas de clasificación como la precisión (en adelante, PREC), la sensibilidad (en adelante, SE), la especificidad (en adelante, SP), el valor predictivo positivo (en adelante, VPP) y el valor predictivo negativo (en adelante, VPN), estableciendo un umbral óptimo, así como su correspondiente IC del 95% (Robin X et al, 2011). El mejor valor de corte para cada modelo se determinó de manera que el porcentaje de predicciones correctas fuera el máximo.

La prueba de Hosmer-Lemeshow se aplicó a los modelos predictivos basados en citoquinas seleccionados, aplicando el paquete Resource Selection (Lele SR et al, 2016). Esta es una medida de calibración, que es significativa para los modelos mal calibrados (Austin PC & Steyerberg EW, 2014). Las curvas de calibración de estos modelos se construyeron gráficamente utilizando el paquete RMS (Frank E & Harrell J, 2015) para evaluar el acuerdo entre las probabilidades predichas y los resultados reales. En un modelo bien calibrado, las predicciones deben caer en una línea diagonal de 45° (Austin PC & Steyerberg EW, 2014).

**Ejemplo 9. Análisis estadístico: Validación interna de los modelos predictivos seleccionados**

Con la finalidad de controlar el posible sobreajuste de los modelos, se determinaron los valores medios del optimismo sobre las medidas de calibración, discriminación y clasificación aplicando métodos "bootstrap". El optimismo es una medida de la validación interna del modelo que indica la magnitud absoluta de error y se obtiene de la diferencia entre los respectivos parámetros del modelo bootstrap con los datos de la muestra bootstrap y el modelo bootstrap con los datos de la muestra original (Efron B & Tibshirani RJ; Steyerberg EW et al, 2001). Este análisis se replicó en 1000 muestras de estudio diferentes con reemplazamiento de datos del mismo tamaño muestral que la original.

Se calcularon los parámetros corregidos por el optimismo (co) de las medidas, de discriminación (en adelante, co-ABC), clasificación (en adelante, co-PREC, co-SE, co-SP, co-VPP y co-VPN) y de calibración. Estos parámetros corregidos se obtuvieron de sus correspondientes medidas aparentes derivadas de la muestra original menos su respectivo valor de optimismo (Efron B & Tibshirani RJ; Steyerberg EW et al, 2001).

**Ejemplo 10. Resultados: Modelización multivariante de los niveles de citoquinas en el fluido crevicular gingival con capacidad predictiva: selección de modelos y validación interna**

Para el análisis predictivo multivariante, tuvimos un total de 147 participantes y 73 eventos de resultado. Como una primera descripción de la relación entre los niveles de citoquinas, casi todas las correlaciones entre ellas, tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias, fueron positivas. La interpretación es que cuando la inflamación asociada con la periodontitis estaba presente, todas las citoquinas mostraron niveles mayores. Además, se observaron correlaciones más altas entre las citoquinas pro-inflamatorias. Particularmente, se detectaron correlaciones positivas muy altas entre algunas citoquinas pro-

inflamatorias muy relevantes en la patogenia de la enfermedad, IL1alfa, IL1beta e IL17A (rho> 0,85). Señalar que estas citoquinas mostraron las mayores diferencias entre ambos grupos de estudio.

5 Aplicando los criterios estadísticos establecidos se obtuvieron 27 modelos predictivos basados en los niveles de las citoquinas, los cuales son descritos en la Tabla 3, así como sus correspondientes valores de ABC aparentes y corregidos.

Respecto a los modelos de una citoquina ajustados por "tabaco", las citoquinas pro-inflamatorias IL1alfa, IL1beta e IL17 fueron las variables predictoras que mostraron mayores valores de ABC (0,973, 0,963, 0,937, respectivamente).

10 En cuanto a los modelos de dos citoquinas ajustados por "tabaco", la incorporación de ciertas citoquinas anti-inflamatorias mejoró los valores de ABC de los mejores modelos basados en una citoquina pro-inflamatoria, especialmente la de IL17A. Las medidas de clasificación de los 27 modelos predictivos se detallan en la Tabla 4; mientras que las medidas de calibración se detallan en la Tabla 5.

**Tabla 3.** Descripción de los 27 modelos predictivos basados en los niveles de las citoquinas y sus correspondientes valores de discriminación aparentes y corregidos.

Descripción del Modelo	ABC aparente	ABC corregido
-50,322+ 3,133xIL1alpha + 1,783xtabaco	0,973	0,972
-27,729 + 2,136xIL1beta + 1,722xtabaco	0,963	0,962
-7,607 + 1,823xIL17A + 1,860xtabaco	0,937	0,935
-71,383 + 4,622xIL1alpha -1,146xIFNgamma + 2,042xtabaco	0,986	0,983
-62,495 + 4,149xIL1alpha -1,158xIL2 + 2,21x4tabaco	0,982	0,980
-56,949 + 3,847xIL1alpha -0,831xIL3 + 1,92x4tabaco	0,980	0,977
-60,877 + 3,899xIL1alpha -0,467xIL4 + 2,027xtabaco	0,978	0,975
-50,152 + 3,141xIL1alpha -0,082xIL5 + 1,782xtabaco	0,973	0,970
-62,194 + 4,055xIL1alpha -0,999xIL10 + 1,617xtabaco	0,985	0,980
-59,907 + 3,857xIL1alpha -0,661xIL12p70 + 1,977xtabaco	0,982	0,979
-54,740 + 3,540xIL1alpha -0,515xIL13 + 2,010xtabaco	0,982	0,979
-31,507 + 2,546xIL1beta -0,648xIFNgamma + 1,918xtabaco	0,969	0,967
-28,347 + 2,297xIL1beta -0,430xIL2 + 1,943xtabaco	0,967	0,964
-27,512 + 2,217xIL1beta -0,221xIL3 + 1,799xtabaco	0,965	0,962
-27,994 + 2,172xIL1beta -0,058xIL4 + 1,745xtabaco	0,964	0,960
-28,997 + 2,172xIL1beta + 0,233xIL5 + 1,686xtabaco	0,964	0,960
-28,811 + 2,331xIL1beta -0,505xIL10 +1,701xtabaco	0,971	0,967
-27,856 + 2,190xIL1beta -0,177xIL12p70 + 1,709xtabaco	0,965	0,961
-27,274 + 2,204xIL1beta -0,329xIL13 + 1,923xtabaco	0,971	0,966
-12,376 + 5,024xIL17A -3,167xIFNgamma + 2,984xtabaco	0,974	0,970

Descripción del Modelo	ABC aparente	ABC corregido
-6,912 + 2,455xIL17A -0,906xIL2 + 2,208xtabaco	0,949	0,944
-4,487 + 3,441xIL17A -1,636xIL3 + 2,661xtabaco	0,961	0,958
-7,777 + 2,060xIL17A -0,218xIL4 + 1,930xtabaco	0,944	0,939
-6,889 + 2,015xIL17A -0,403xIL5 + 1,875xtabaco	0,944	0,940
-7,533 + 2,766xIL17A -1,234xIL10 + 1,610xtabaco	0,965	0,959
-7,999 + 2,536xIL17A -0,714xIL12p70 + 1,808xtabaco	0,958	0,953
-8,087 + 3,023xIL17A -1,014xIL13 + 2,784xtabaco	0,973	0,969

En la segunda columna, el valor corresponde a las medidas de discriminación aparentes y en la tercera columna, a las mismas medidas de discriminación corregidas por el optimismo calculado por técnicas bootstrap.

5 El modelo IL1beta presentó el mayor porcentaje de co-PREC (93,27%, co-SE= 92,64%, co-SP= 93,91%), seguido de IL1alfa (91,82%; co-SE= 92,99%, co-SP= 90,81%), e IL17A (88,00%, co-SE= 88,25%, co-SP= 87,82%). El modelo IL1alfa fue el mejor calibrado gráficamente, mostrando éste predictor un efecto lineal sobre el resultado. El modelo IL1alfa presentó una intercept corregida de -0,024 y una pendiente corregida de 0,939. El valor de la prueba de Hosmer-Lemeshow no fue significativo ( $P = 0,504$ ).

10 En relación a la IL1alfa y otras citoquinas anti-inflamatorias, los tres modelos que aportaron mayores incrementos en los valores de co-PREC con respecto al modelo de una variable IL1alfa (co-PREC= 91,82%) fueron: IL1alfa + IFNgamma (co-PREC= 93,67%; co-SE= 91,60%, co-SP= 95,75%), IL1alfa + IL12p70 (co-PREC= 92,97%; co-SE= 92,92%, co-SP= 93,12%) e IL1alfa +IL13 (co-PREC= 93,27%; co-SE= 88,02%, co-SP= 98,54%). El modelo IL1alfa + IL12p70 fue el mejor calibrado gráficamente, presentando una intercept corregida de -0,013 y una pendiente corregida de 0,897. En los tres modelos, el valor de la prueba de Hosmer-Lemeshow fue no significativo ( $P = 0,891, 0,733$  y  $0,938$ , respectivamente).

20 En relación a la IL1beta y otras citoquinas anti-inflamatorias, los tres modelos que aportaron mayores incrementos en los valores de co-PREC con respecto al modelo de una variable IL1beta (co-PREC= 93,27%) fueron: IL1beta + IFNgamma (co-PREC= 93,77%; co-SE= 95,07%, co-SP= 92,55%), IL1beta + IL2 (co-PREC= 93,92%; co-SE= 95,88%, co-SP= 92,03%) e IL1beta +IL12p70 (co-PREC= 94,30%; co-SE= 96,20%, co-SP= 92,45%). Ninguno de estos modelos de dos variables mostró una buena caligración gráfica y solamente el modelo IL1beta + IFNgamma presentó un valor de la prueba de Hosmer-Lemeshow no significativo ( $P = 0,051$ ).

25 En relación a la IL17A y otras citoquinas anti-inflamatorias, los tres modelos que aportaron mayores incrementos en los valores de co-PREC con respecto al modelo de una variable IL17A fueron: IL17A + IFNgamma (co-PREC= 91,11%; co-SE= 89,05%, co-SP= 93,21%), IL117A + IL3 (co-PREC= 92,30%; co-SE= 89,36%, co-SP= 95,30%) e IL17A +IL12p70 (co-PREC= 92,15%; co-SE= 88,80%, co-SP= 95,55%). El modelo IL17A + IFNgamma fue el mejor calibrado gráficamente, mostrando éste predictor un efecto lineal sobre el resultado. El modelo IL17A + IFNgamma presentó una intercept corregida de -0,014 y una pendiente corregida de 0,884. En los tres modelos, el valor de la prueba de Hosmer-Lemeshow fue no significativo ( $P = 0,522, 0,000$  y  $0,000$ , respectivamente).

30 Las Figuras 1 y 2 muestran las curvas ROC y las gráficas de calibración, incluyendo las medidas corregidas por el optimismo de los modelos basados en una citoquina pro-inflamatoria y en los de dos citoquinas (una, pro-inflamatoria y otra, anti-inflamatoria).

35

**Tabla 4.** Medidas de discriminación y clasificación de los modelos basados en los niveles de citoquinas en el fluido gingival crevicular ajustados por la variable “hábito tabáquico”.

<b>Modelo</b>	<b>Precisión (%)</b>	<b>Sensibilidad (%)</b>	<b>Especificidad (%)</b>	<b>Valor Predictivo Positivo (%)</b>	<b>Valor Predictivo Negativo (%)</b>
<b>IL1alpha + tabaco</b>	93.197 91.826	94.521 92.996	91.892 90.819	92.105 90.935	94.521 93.125
<b>IL1beta + tabaco</b>	93.878 93.273	93.151 92.641	94.595 93.910	94.521 93.893	93.421 92.921
<b>IL17A + tabaco</b>	89.116 88.006	89.041 88.250	89.189 87.825	89.041 87.733	89.333 88.556
<b>IL1alpha + IFNgamma + tabaco</b>	95.238 93.673	93.151 91.604	97.297 95.758	97.183 95.658	93.590 92.177
<b>IL1alpha + IL2 + tabaco</b>	93.878 92.085	98.630 96.923	89.189 87.462	90.000 88.249	98.529 96.906
<b>IL1alpha + IL3 + tabaco</b>	93.878 92.107	87.671 86.006	100.000 98.257	100.000 98.276	89.157 87.518
<b>IL1alpha + IL4 + tabaco</b>	93.878 92.237	93.151 91.633	94.595 92.93	94.521 92.851	93.421 92.000
<b>IL1alpha + IL5 + tabaco</b>	93.878 92.173	95.890 94.198	91.892 90.295	92.208 90.539	95.833 94.244
<b>IL1alpha + IL10 + tabaco</b>	92.517 90.820	93.151 91.192	91.892 90.564	92.000 90.630	93.243 91.444
<b>IL1alpha + IL12p70 + tabaco</b>	94.558 92.978	94.521 92.929	94.595 93.128	94.595 93.143	94.667 93.081
<b>IL1alpha + IL13 + tabaco</b>	94.558 93.272	89.041 88.029	100.000 98.540	100.000 98.502	90.244 89.247
<b>IL1beta + IFNgamma + tabaco</b>	94.558 93.776	95.890 95.070	93.243 92.55	93.421 92.702	95.890 95.105
<b>IL1beta + IL2 + tabaco</b>	95.238 93.922	97.260 95.884	93.243 92.039	93.506 92.332	97.222 95.882
<b>IL1beta + IL3 + tabaco</b>	93.878 92.856	93.151 91.992	94.595 93.741	94.521 93.666	93.421 92.276
<b>IL1beta + IL4 + tabaco</b>	94.558 93.544	95.890 94.494	93.243 92.640	93.421 92.801	95.890 94.587
<b>IL1beta + IL5 + tabaco</b>	94.558 93.328	94.521 93.203	94.595 93.498	94.595 93.485	94.595 93.361
<b>IL1beta + IL10 + tabaco</b>	94.558 93.563	94.521 93.375	94.595 93.778	94.595 93.755	94.667 93.571
<b>IL1beta + IL12p70 + tabaco</b>	95.238 94.308	97.260 96.203	93.243 92.458	93.506 92.778	97.222 96.162
<b>IL1beta + IL13 + tabaco</b>	94.558 93.378	95.890 94.44	93.243 92.427	93.421 92.491	95.890 94.528
<b>IL17A + IFNgamma + tabaco</b>	92.517 91.11	90.411 89.053	94.595 93.217	94.366 92.997	91.026 89.720
<b>IL17A + IL2 + tabaco</b>	91.837 90.066	86.301 84.995	97.297 95.193	97.015 94.966	87.952 86.635
<b>IL17A + IL3 + tabaco</b>	93.878 92.309	90.411 89.367	97.297 95.308	97.101 95.175	91.139 90.049
<b>IL17A + IL4 + tabaco</b>	91.837 90.459	89.041 87.850	94.595 93.079	94.286 92.745	89.873 88.826
<b>IL17A + IL5 + tabaco</b>	89.796 87.691	84.932 83.097	94.595 92.374	94.030 91.765	86.585 84.850
<b>IL17A + IL10 + tabaco</b>	91.156 89.044	87.671 85.418	94.595 92.795	94.203 92.244	88.750 86.658
<b>IL17A + IL12p70 + tabaco</b>	93.878 92.151	90.411 88.803	97.297 95.557	97.101 95.389	91.139 89.570

Modelo	Precisión (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor Predictivo Positivo (%)	Valor Predictivo Negativo (%)
<b>IL17A + IL13 + tabaco</b>	91.837	90.411	93.243	93.056	90.789
	89.460	88.330	90.802	90.576	88.796

En cada celda, el primer valor corresponde a las medidas de discriminación y clasificación aparentes y el segundo valor a las mismas medidas corregidas por el optimismo calculado por técnicas bootstrap.

5 **Tabla 5.** Medidas de calibración de los modelos basados en los niveles de citoquinas en el fluido gingival crevicular ajustados por la variable “hábito tabáquico”.

Modelo	Intercepto	Pendiente
<b>IL1alpha + tabaco</b>	0 -0.0248	1 0.9396
<b>IL1beta + tabaco</b>	0 -0.0012	1 0.9598
<b>IL17A + tabaco</b>	0 -0.0004	1 0.9597
<b>IL1alpha + IFNgamma + tabaco</b>	0 -0.0415	1 0.8746
<b>IL1alpha + IL2 + tabaco</b>	0 -0.049	1 0.8906
<b>IL1alpha + IL3 + tabaco</b>	0 -0.0314	1 0.9042
<b>IL1alpha + IL4 + tabaco</b>	0 -0.0366	1 0.9135
<b>IL1alpha + IL5 + tabaco</b>	0 -0.0377	1 0.9148
<b>IL1alpha + IL10 + tabaco</b>	0 -0.0217	1 0.8486
<b>IL1alpha + IL12p70 + tabaco</b>	0 -0.0134	1 0.8973
<b>IL1alpha + IL13 + tabaco</b>	0 -0.0517	1 0.8878
<b>IL1beta + IFNgamma + tabaco</b>	0 0.0025	1 0.9327
<b>IL1beta + IL2 + tabaco</b>	0 -0.0162	1 0.9253
<b>IL1beta + IL3 + tabaco</b>	0 0.0020	1 0.9303
<b>IL1beta + IL4 + tabaco</b>	0 -0.0126	1 0.9436
<b>IL1beta + IL5 + tabaco</b>	0 -0.0252	1 0.9233
<b>IL1beta + IL10 + tabaco</b>	0 -0.0024	1 0.9120
<b>IL1beta + IL12p70 + tabaco</b>	0 -0.0114	1 0.9180
<b>IL1beta + IL13 + tabaco</b>	0 -0.0018	1 0.9125
<b>IL17A + IFNgamma + tabaco</b>	0 -0.0142	1 0.8849
<b>IL17A + IL2 + tabaco</b>	0 -0.0260	1 0.9153
<b>IL17A + IL3 + tabaco</b>	0 -0.0252	1 0.9322

<b>Modelo</b>	<b>Intercepto</b>	<b>Pendiente</b>
<b>IL17A + IL4 + tabaco</b>	0 -0.0286	1 0.9275
<b>IL17A + IL5 + tabaco</b>	0 -0.0294	1 0.9233
<b>IL17A + IL10 + tabaco</b>	0 -0.0051	1 0.8945
<b>IL17A + IL12p70 + tabaco</b>	0 -0.0046	1 0.9150
<b>IL17A + IL13 + tabaco</b>	0 0.0358	1 0.8687

En cada celda, el primer valor corresponde a las medidas de calibración aparentes y el segundo valor a las mismas medidas corregidas por el optimismo calculado por técnicas bootstra

## REIVINDICACIONES

1. Método in vitro para diagnosticar una enfermedad periodontal en un sujeto, que comprende:
- 5 a) Determinar el nivel de expresión de, al menos, dos citoquinas seleccionadas entre las siguientes: IL1alfa, IL1beta, IL17A, IFNgamma, IL2, IL12p70, IL3, IL4, IL5, IL10 e IL13 en una muestra oral del sujeto;
- b) Determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador en dicho sujeto;
- 10 c) Obtener un valor de probabilidad asociado al nivel de expresión de las citoquinas, a través de modelos predictivos multivariantes, que refiere la probabilidad de padecer una enfermedad periodontal. Cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe una mayor certeza en el diagnóstico de una enfermedad periodontal. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de padecer o no una enfermedad periodontal. Este valor de probabilidad es obtenido bien mediante el uso de software específico para la lectura de la prueba que aporta este valor de probabilidad o bien mediante la aportación de dicha información de probabilidad al usuario en cualquier formato, incluyendo las formas oral, escrita, gráfica o electrónica para que la compare con los valores que ha obtenido.
- 15
2. Método in vitro según reivindicación 1 que comprende:
- 20 a) Determinar el nivel de expresión de dos de las citoquinas seleccionadas entre las siguientes: IL1alfa, IL1beta, IL17A, IFNgamma, IL2, IL12p70, IL3, IL4, IL5, IL10 e IL13 en una muestra oral del sujeto;
- b) Determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador en dicho sujeto;
- 25 c) Obtener un valor de probabilidad asociado al nivel de expresión de las citoquinas, a través de modelos predictivos multivariantes, que refiere la probabilidad de padecer una enfermedad periodontal. Cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe una mayor certeza en el diagnóstico de una enfermedad periodontal. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de padecer o no una enfermedad periodontal. Este valor de probabilidad es obtenido bien mediante el uso de software específico para la lectura de la prueba que aporta este valor de probabilidad o bien mediante la aportación de dicha información de probabilidad al usuario en cualquier formato, incluyendo las formas oral, escrita, gráfica o electrónica para que la compare con los valores que ha obtenido.
- 30
3. Método in vitro según las reivindicaciones 1 y 2 en los que los modelos predictivos multivariantes utilizados son, al menos, uno de los siguientes:
- 35  $-71,383 + 4,622 \times \text{IL1alpha} - 1,146 \times \text{IFNgamma} + 2,042 \times \text{tabaco};$   
 $-62,495 + 4,149 \times \text{IL1alpha} - 1,158 \times \text{IL2} + 2,214 \times \text{tabaco};$   
 $-56,949 + 3,847 \times \text{IL1alpha} - 0,831 \times \text{IL3} + 1,924 \times \text{tabaco};$   
 $-60,877 + 3,899 \times \text{IL1alpha} - 0,467 \times \text{IL4} + 2,027 \times \text{tabaco};$   
 $-50,152 + 3,141 \times \text{IL1alpha} - 0,082 \times \text{IL5} + 1,782 \times \text{tabaco};$   
 $-62,194 + 4,055 \times \text{IL1alpha} - 0,999 \times \text{IL10} + 1,617 \times \text{tabaco};$   
 $-59,907 + 3,857 \times \text{IL1alpha} - 0,661 \times \text{IL12p70} + 1,977 \times \text{tabaco};$   
 $-54,740 + 3,540 \times \text{IL1alpha} - 0,515 \times \text{IL13} + 2,010 \times \text{tabaco};$   
 $-31,507 + 2,546 \times \text{IL1beta} - 0,648 \times \text{IFNgamma} + 1,918 \times \text{tabaco};$   
 $-28,347 + 2,297 \times \text{IL1beta} - 0,430 \times \text{IL2} + 1,943 \times \text{tabaco};$   
 $-27,512 + 2,217 \times \text{IL1beta} - 0,221 \times \text{IL3} + 1,799 \times \text{tabaco};$   
 $-27,994 + 2,172 \times \text{IL1beta} - 0,058 \times \text{IL4} + 1,745 \times \text{tabaco};$   
 $-28,997 + 2,172 \times \text{IL1beta} + 0,233 \times \text{IL5} + 1,686 \times \text{tabaco};$   
 $-28,811 + 2,331 \times \text{IL1beta} - 0,505 \times \text{IL10} + 1,701 \times \text{tabaco};$   
 $-27,856 + 2,190 \times \text{IL1beta} - 0,177 \times \text{IL12p70} + 1,709 \times \text{tabaco};$   
 $-27,274 + 2,204 \times \text{IL1beta} - 0,329 \times \text{IL13} + 1,923 \times \text{tabaco};$   
 $-12,376 + 5,024 \times \text{IL17A} - 3,167 \times \text{IFNgamma} + 2,984 \times \text{tabaco};$   
 $-6,912 + 2,455 \times \text{IL17A} - 0,906 \times \text{IL2} + 2,208 \times \text{tabaco};$   
 $-4,487 + 3,441 \times \text{IL17A} - 1,636 \times \text{IL3} + 2,661 \times \text{tabaco};$   
 $-7,777 + 2,060 \times \text{IL17A} - 0,218 \times \text{IL4} + 1,930 \times \text{tabaco};$   
 $-6,889 + 2,015 \times \text{IL17A} - 0,403 \times \text{IL5} + 1,875 \times \text{tabaco};$   
 $-7,533 + 2,766 \times \text{IL17A} - 1,234 \times \text{IL10} + 1,610 \times \text{tabaco};$   
 $-7,999 + 2,536 \times \text{IL17A} - 0,714 \times \text{IL12p70} + 1,808 \times \text{tabaco};$   
 $-8,087 + 3,023 \times \text{IL17A} - 1,014 \times \text{IL13} + 2,784 \times \text{tabaco}.$
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60 4. Método in vitro según la reivindicación 1 a 3 en el que dicha enfermedad periodontal se selecciona de gingivitis o periodontitis.

5. Método in vitro según la reivindicación 4 en el que dicha enfermedad es gingivitis, en cuyo caso el valor de probabilidad corresponde a los niveles de expresión de las citoquinas medidos en una muestra oral de un sujeto con gingivitis.
- 5 6. Método in vitro según la reivindicación 4 en el que dicha enfermedad es periodontitis, en cuyo caso el valor de probabilidad corresponde a los niveles de expresión de las citoquinas medidas en una muestra oral de un sujeto con periodontitis.
7. Método in vitro según la reivindicación 6 en el que dicha enfermedad es periodontitis crónica, en cuyo caso el valor de probabilidad corresponde a los niveles de expresión de las citoquinas medidas en una muestra oral de un sujeto con periodontitis crónica.
- 10 8. Método in vitro según la reivindicación 6 en el que dicha enfermedad es periodontitis agresiva, en cuyo caso el valor de probabilidad corresponde a los niveles de expresión de las citoquinas medidas en una muestra oral de un sujeto con periodontitis agresiva.
9. Método in vitro según la reivindicación 1 a 8 en la que la muestra oral es tejido gingival, fluido crevicular gingival o saliva.
- 15 10. Método in vitro según la reivindicación 9 en la que la muestra oral es fluido crevicular gingival.
11. Método in vitro según reivindicaciones de la 1 a 10 en el que dicho nivel de expresión de la citoquina comprende determinar el nivel de ARNm codificado por el gen de las citoquinas o determinar el nivel de la proteína de las citoquinas.
- 20 12. Método in vitro según reivindicación 11 en el que dicho nivel de expresión de la citoquina comprende determinar el nivel de la proteína.
13. Método in vitro según la reivindicación 11 y 12 en el que la determinación de los niveles de citoquinas se realiza mediante un método seleccionado de inmunohistoquímica, transferencia de tipo Western, citometría de flujo o mediante ELISA.
- 25 14. Método in vitro para determinar el riesgo de desarrollar en un futuro una enfermedad periodontal en un sujeto con salud gingival/periodontal que comprende:
  - a) Determinar el nivel de expresión de, al menos, dos citoquinas seleccionadas entre las siguientes: IL1alfa, IL1beta, IL17A, IFN gamma, IL2, IL12p70, IL3, IL4, IL5, IL10 e IL13 en una muestra oral del sujeto;
  - b) Determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador en dicho sujeto;
  - 30 c) Obtener un valor de probabilidad asociado al nivel de expresión de las citoquinas, a través de modelos predictivos multivariantes, que refiere la probabilidad de riesgo de padecer en un futuro una enfermedad periodontal detectable clínicamente. Cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe un mayor riesgo de padecer una futura enfermedad periodontal. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de padecer o no la futura enfermedad periodontal. Este valor de probabilidad es obtenido bien mediante el uso de software específico para la lectura de la prueba que aporta este valor de probabilidad o bien mediante la aportación de dicha información de probabilidad al usuario en cualquier formato, incluyendo las formas oral, escrita, gráfica o electrónica para que la compare con los valores que ha obtenido.
- 40 15. Método in vitro según la reivindicación 14 que comprende:
  - d) Determinar el nivel de expresión de dos citoquinas seleccionadas entre las siguientes: IL1alfa, IL1beta, IL17A, IFN gamma, IL2, IL12p70, IL3, IL4, IL5, IL10 e IL13 en una muestra oral del sujeto;
  - 45 e) Determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador en dicho sujeto;
  - f) Obtener un valor de probabilidad asociado al nivel de expresión de las citoquinas, a través de modelos predictivos multivariantes, que refiere la probabilidad de riesgo de padecer en un futuro una enfermedad periodontal. Cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe un mayor riesgo de padecer una futura enfermedad periodontal. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de padecer o no la futura enfermedad periodontal. Este valor de probabilidad es obtenido bien mediante el uso de software específico para la lectura de la prueba que aporta este valor de probabilidad o
- 50

bien mediante la aportación de dicha información de probabilidad al usuario en cualquier formato, incluyendo las formas oral, escrita, gráfica o electrónica para que la compare con los valores que ha obtenido.

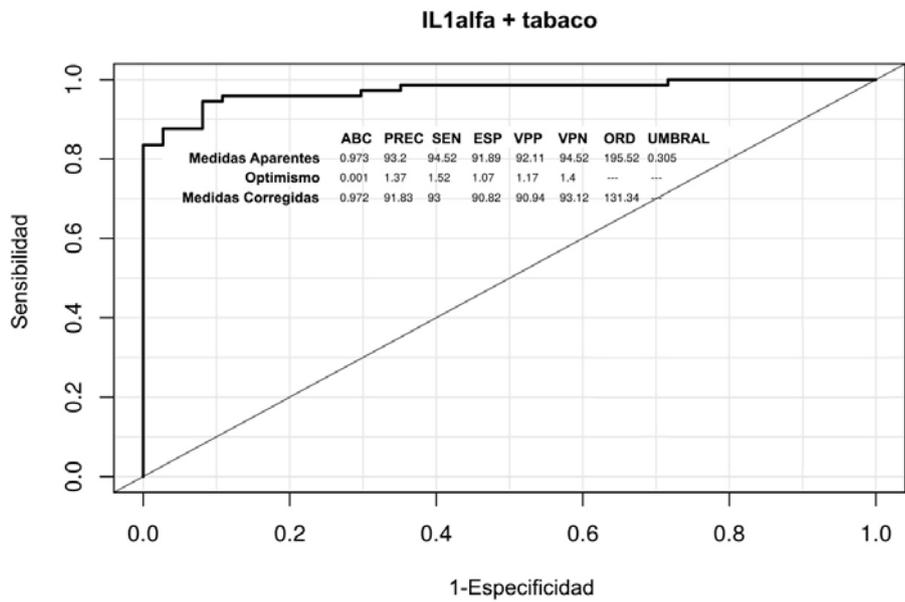
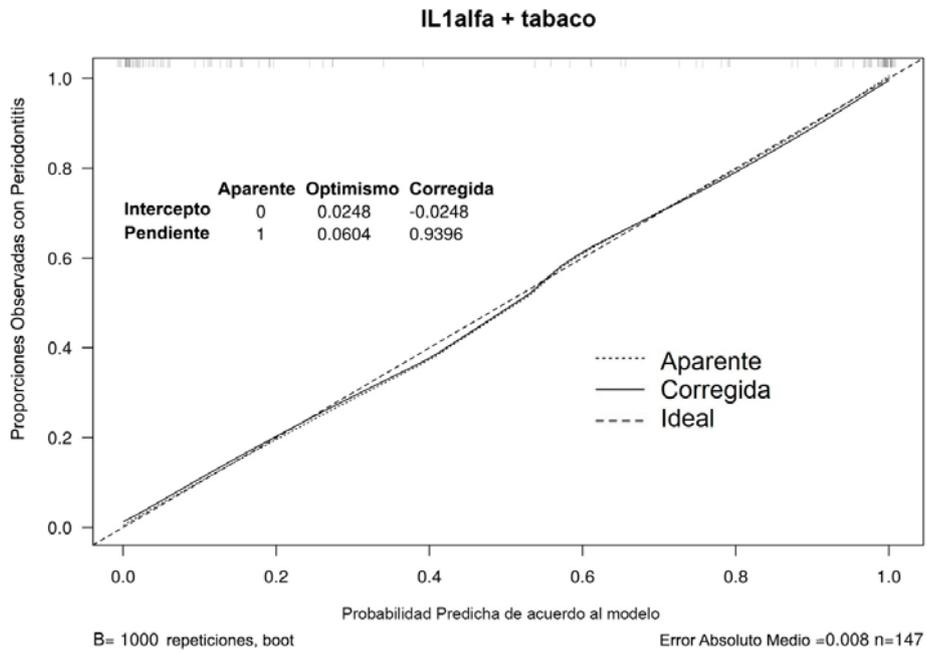
- 5 16. Método in vitro según las reivindicaciones 14 y 15 en los que los modelos predictivos multivariantes utilizados son, al menos, uno de los siguientes:
- 10 -71,383 + 4,622xIL1alpha -1,146xIFNgamma + 2,042xtabaco;  
 -62,495 + 4,149xIL1alpha -1,158xIL2 + 2,214xtabaco;  
 -56,949 + 3,847xIL1alpha -0,831xIL3 + 1,924xtabaco;  
 -60,877 + 3,899xIL1alpha -0,467xIL4 + 2,027xtabaco;  
 -50,152 + 3,141xIL1alpha -0,082xIL5 + 1,782xtabaco;  
 -62,194 + 4,055xIL1alpha -0,999xIL10 + 1,617xtabaco;  
 -59,907 + 3,857xIL1alpha -0,661xIL12p70 + 1,977xtabaco;  
 15 -54,740 + 3,540xIL1alpha -0,515xIL13 + 2,010xtabaco;  
 -31,507 + 2,546xIL1beta -0,648xIFNgamma + 1,918xtabaco;  
 -28,347 + 2,297xIL1beta -0,430xIL2 + 1,943xtabaco;  
 -27,512 + 2,217xIL1beta -0,221xIL3 + 1,799xtabaco;  
 -27,994 + 2,172xIL1beta -0,058xIL4 + 1,745xtabaco;  
 20 -28,997 + 2,172xIL1beta + 0,233xIL5 + 1,686xtabaco;  
 -28,811 + 2,331xIL1beta -0,505xIL10 + 1,701xtabaco  
 -27,856 + 2,190xIL1beta -0,177xIL12p70 + 1,709xtabaco;  
 -27,274 + 2,204xIL1beta -0,329xIL13 + 1,923xtabaco;  
 -12,376 + 5,024xIL17A -3,167xIFNgamma + 2,984xtabaco  
 25 -6,912 + 2,455xIL17A -0,906xIL2 + 2,208xtabaco;  
 -4,487 + 3,441xIL17A -1,636xIL3 + 2,661xtabaco;  
 -7,777 + 2,060xIL17A -0,218xIL4 + 1,930xtabaco;  
 -6,889 + 2,015xIL17A -0,403xIL5 + 1,875xtabaco;  
 -7,533 + 2,766xIL17A -1,234xIL10 + 1,610xtabaco;  
 30 -7,999 + 2,536xIL17A -0,714xIL12p70 + 1,808xtabaco;  
 -8,087 + 3,023xIL17A -1,014xIL13 + 2,784xtabaco.
- 35 17. Método in vitro según reivindicaciones 14 a 16 en donde dicha enfermedad periodontal se selecciona de gingivitis o periodontitis.
18. Método in vitro según reivindicaciones de 14 a 17, en el que la muestra de dicho sujeto se selecciona de tejido gingival, fluido crevicular gingival o saliva.
- 40 19. Método in vitro según la reivindicación 18 en la que la muestra es fluido crevicular gingival.
20. Método in vitro según reivindicaciones de 14 a 19, en el que dicho nivel de expresión comprende determinar el nivel de ARNm codificado por el gen de las citoquinas o determinar el nivel de la proteína de las citoquinas.
- 45 21. Método in vitro según reivindicación 20 en el que dicho nivel de expresión de la citoquina comprende determinar el nivel de la proteína.
- 50 22. Método in vitro según reivindicación 20 y 21 en el que la determinación de los niveles de citoquinas se realiza mediante un método seleccionado de inmunohistoquímica, transferencia de tipo Western, citometría de flujo o mediante ELISA.
23. Método in vitro para determinar la respuesta a un tratamiento específico de un paciente con enfermedad periodontal que comprende:
- 55 g) Determinar el nivel de expresión de, al menos, dos citoquinas seleccionadas entre las siguientes: IL1alfa, IL1beta, IL17A, IFN gamma, IL2, IL12p70, IL3, IL4, IL5, IL10 e IL13 en una muestra oral del sujeto;  
 h) Determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador en dicho sujeto;

- 5 i) Obtener un valor de probabilidad asociado al nivel de expresión de las citoquinas, a través de modelos predictivos multivariantes, que refiere la probabilidad de una peor respuesta a un determinado tratamiento clínico de un paciente con enfermedad periodontal En cuyo caso cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe peor respuesta a un determinado tratamiento clínico. El valor 0,5 es indicativo de existir la misma probabilidad de respuesta negativa o positiva a un determinado tratamiento clínico.
24. Método in vitro según reivindicación 23 que comprende:
- 10 j) Determinar el nivel de expresión de dos citoquinas seleccionadas entre las siguientes: IL1alfa, IL1beta, IL17A, IFN gamma, IL2, IL12p70, IL3, IL4, IL5, IL10 e IL13 en una muestra oral del sujeto;
- 15 k) Determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador en dicho sujeto;
- l) Obtener un valor de probabilidad asociado al nivel de expresión de las citoquinas, a través de modelos predictivos multivariantes, que refiere la probabilidad de una peor respuesta a un determinado tratamiento clínico de un paciente con enfermedad periodontal En cuyo caso cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe peor respuesta a un determinado tratamiento clínico. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de respuesta negativa o positiva a un determinado tratamiento clínico. Este valor de probabilidad es obtenido bien mediante el uso de software específico para la lectura de la prueba que aporta este valor de probabilidad o bien mediante la aportación de dicha información de probabilidad al usuario en cualquier formato, incluyendo las formas oral, escrita, gráfica o electrónica para que la compare con los valores que ha obtenido.
- 25 25. Método in vitro según las reivindicaciones 23 y 24 en los que los modelos predictivos multivariantes utilizados son, al menos, uno de los siguientes:
- 30  $-71,383 + 4,622 \times \text{IL1alpha} - 1,146 \times \text{IFNgamma} + 2,042 \times \text{tabaco};$   
 $-62,495 + 4,149 \times \text{IL1alpha} - 1,158 \times \text{IL2} + 2,214 \times \text{tabaco};$   
 $-56,949 + 3,847 \times \text{IL1alpha} - 0,831 \times \text{IL3} + 1,924 \times \text{tabaco};$   
 $-60,877 + 3,899 \times \text{IL1alpha} - 0,467 \times \text{IL4} + 2,027 \times \text{tabaco};$   
 $-50,152 + 3,141 \times \text{IL1alpha} - 0,082 \times \text{IL5} + 1,782 \times \text{tabaco};$   
 $-62,194 + 4,055 \times \text{IL1alpha} - 0,999 \times \text{IL10} + 1,617 \times \text{tabaco};$   
35  $-59,907 + 3,857 \times \text{IL1alpha} - 0,661 \times \text{IL12p70} + 1,977 \times \text{tabaco};$   
 $-54,740 + 3,540 \times \text{IL1alpha} - 0,515 \times \text{IL13} + 2,010 \times \text{tabaco};$   
 $-31,507 + 2,546 \times \text{IL1beta} - 0,648 \times \text{IFNgamma} + 1,918 \times \text{tabaco};$   
 $-28,347 + 2,297 \times \text{IL1beta} - 0,430 \times \text{IL2} + 1,943 \times \text{tabaco};$   
 $-27,512 + 2,217 \times \text{IL1beta} - 0,221 \times \text{IL3} + 1,799 \times \text{tabaco};$   
40  $-27,994 + 2,172 \times \text{IL1beta} - 0,058 \times \text{IL4} + 1,745 \times \text{tabaco};$   
 $-28,997 + 2,172 \times \text{IL1beta} + 0,233 \times \text{IL5} + 1,686 \times \text{tabaco};$   
 $-28,811 + 2,331 \times \text{IL1beta} - 0,505 \times \text{IL10} + 1,701 \times \text{tabaco};$   
 $-27,856 + 2,190 \times \text{IL1beta} - 0,177 \times \text{IL12p70} + 1,709 \times \text{tabaco};$   
 $-27,274 + 2,204 \times \text{IL1beta} - 0,329 \times \text{IL13} + 1,923 \times \text{tabaco};$   
45  $-12,376 + 5,024 \times \text{IL17A} - 3,167 \times \text{IFNgamma} + 2,984 \times \text{tabaco};$   
 $-6,912 + 2,455 \times \text{IL17A} - 0,906 \times \text{IL2} + 2,208 \times \text{tabaco};$   
 $-4,487 + 3,441 \times \text{IL17A} - 1,636 \times \text{IL3} + 2,661 \times \text{tabaco};$   
 $-7,777 + 2,060 \times \text{IL17A} - 0,218 \times \text{IL4} + 1,930 \times \text{tabaco};$   
 $-6,889 + 2,015 \times \text{IL17A} - 0,403 \times \text{IL5} + 1,875 \times \text{tabaco};$   
50  $-7,533 + 2,766 \times \text{IL17A} - 1,234 \times \text{IL10} + 1,610 \times \text{tabaco};$   
 $-7,999 + 2,536 \times \text{IL17A} - 0,714 \times \text{IL12p70} + 1,808 \times \text{tabaco};$   
 $-8,087 + 3,023 \times \text{IL17A} - 1,014 \times \text{IL13} + 2,784 \times \text{tabaco}.$
- 55 26. Método in vitro según reivindicaciones 23 a 25, en donde dicha enfermedad periodontal se selecciona de gingivitis o periodontitis.
27. Método in vitro según la reivindicación 26 en el que dicha enfermedad es gingivitis, en cuyo caso el valor de probabilidad corresponde a los niveles de expresión de las citoquinas medidos en una muestra de un sujeto con gingivitis.
- 60

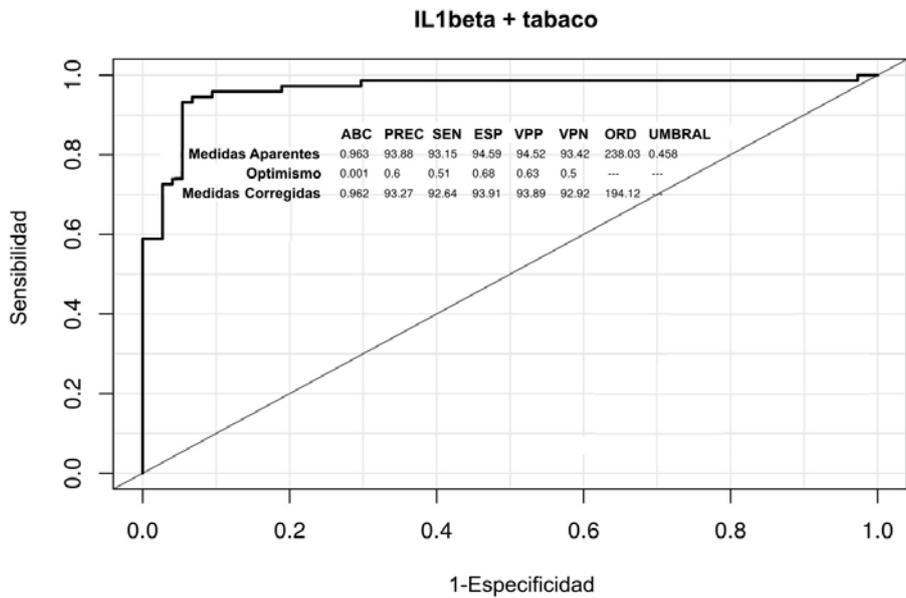
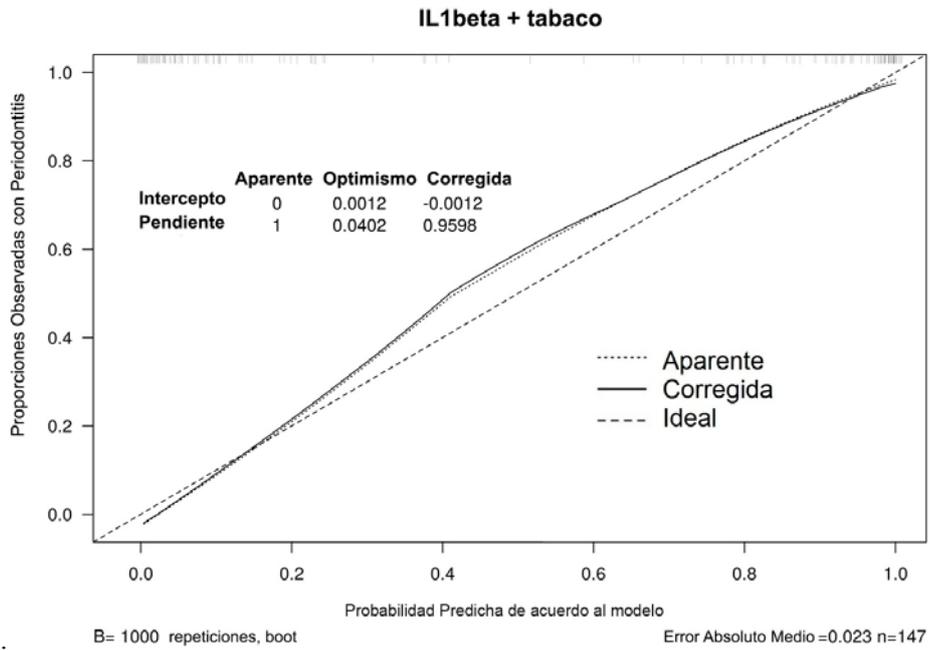
28. Método in vitro según la reivindicación 26 en el que dicha enfermedad es periodontitis, en cuyo caso el valor de probabilidad corresponde a los niveles de expresión de las citoquinas medidas en una muestra de un sujeto con periodontitis.
- 5 29. Método in vitro según la reivindicación 28 en el que dicha enfermedad es periodontitis crónica, en cuyo caso el valor de probabilidad corresponde a los niveles de expresión de las citoquinas medidas en una muestra de un sujeto con periodontitis crónica.
30. Método in vitro según la reivindicación 28 en el que dicha enfermedad es periodontitis agresiva, en cuyo caso el valor de probabilidad corresponde a los niveles de expresión de las citoquinas medidas en una muestra de un sujeto con periodontitis agresiva.
- 10 31. Método in vitro según reivindicaciones de 23 a 30, en el que la muestra de dicho sujeto se selecciona de tejido gingival, fluido crevicular gingival o saliva.
32. Método in vitro según la reivindicación 31 en la que la muestra es fluido crevicular gingival.
- 15 33. Método in vitro según reivindicaciones de 23 a 31, en el que dicho nivel de expresión comprende determinar el nivel de ARNm codificado por el gen de las citoquinas o determinar el nivel de la proteína de las citoquinas.
- 20 34. Un método in vitro según reivindicación 33 en el que dicho nivel de expresión de la citoquina comprende determinar el nivel de la proteína.
35. Un método in vitro según reivindicación 33 y 34 en el que la determinación de los niveles de citoquinas se realiza mediante un método seleccionado de inmunohistoquímica, transferencia de tipo Western, citometría de flujo o mediante ELISA.
- 25 36. Kit para diagnóstico de la enfermedad, del riesgo de padecer la enfermedad y/o de la efectividad de un tratamiento en una enfermedad periodontal que comprende:
- a) un anticuerpo, un polipéptido, un cebador y/o una sonda que se une específicamente a la citoquina.
- b) Unas instrucciones
- 30 c) Un control positivo
- d) Un control negativo
37. Kit según la reivindicación 36 que además incluye información para el cálculo del diagnóstico de la enfermedad, del riesgo de padecer la enfermedad y/o de la efectividad del tratamiento, en forma de modelo predictivo multivariante, en base a los niveles de expresión de las citoquinas.
- 35 38. Kit según la reivindicación 37 en el que la información para el cálculo del diagnóstico de la enfermedad, del riesgo de padecer la enfermedad y/o de la efectividad del tratamiento se obtiene mediante la aplicación de, al menos uno, de los siguientes modelos predictivos multivariantes:
- 71,383 + 4,622xIL1alpha -1,146xIFNgamma + 2,042xtabaco;
- 40 -62,495 + 4,149xIL1alpha -1,158xIL2 + 2,214xtabaco;
- 56,949 + 3,847xIL1alpha -0,831xIL3 + 1,924xtabaco;
- 60,877 + 3,899xIL1alpha -0,467xIL4 + 2,027xtabaco;
- 50,152 + 3,141xIL1alpha -0,082xIL5 + 1,782xtabaco;
- 62,194 + 4,055xIL1alpha -0,999xIL10 + 1,617xtabaco;
- 45 -59,907 + 3,857xIL1alpha -0,661xIL12p70 + 1,977xtabaco;
- 54,740 + 3,540xIL1alpha -0,515xIL13 + 2,010xtabaco;
- 31,507 + 2,546xIL1beta -0,648xIFNgamma + 1,918xtabaco;
- 28,347 + 2,297xIL1beta -0,430xIL2 + 1,943xtabaco;
- 27,512 + 2,217xIL1beta -0,221xIL3 + 1,799xtabaco;
- 27,994 + 2,172xIL1beta -0,058xIL4 + 1,745xtabaco;
- 50 -28,997 + 2,172xIL1beta + 0,233xIL5 + 1,686xtabaco;
- 28,811 + 2,331xIL1beta -0,505xIL10 +1,701xtabaco

- 5
- 10
- 27,856 + 2,190xIL1beta -0,177xIL12p70 + 1,709xtabaco;
  - 27,274 + 2,204xIL1beta -0,329xIL13 + 1,923xtabaco;
  - 12,376 + 5,024xIL17A -3,167xIFNgamma + 2,984xtabaco
  - 6,912 + 2,455xIL17A -0,906xIL2 + 2,208xtabaco;
  - 4,487 + 3,441xIL17A -1,636xIL3 + 2,661xtabaco;
  - 7,777 + 2,060xIL17A -0,218xIL4 + 1,930xtabaco;
  - 6,889 + 2,015xIL17A -0,403xIL5 + 1,875xtabaco;
  - 7,533 + 2,766xIL17A -1,234xIL10 + 1,610xtabaco;
  - 7,999 + 2,536xIL17A -0,714xIL12p70 + 1,808xtabaco;
  - 8,087 + 3,023xIL17A -1,014xIL13 + 2,784xtabaco.

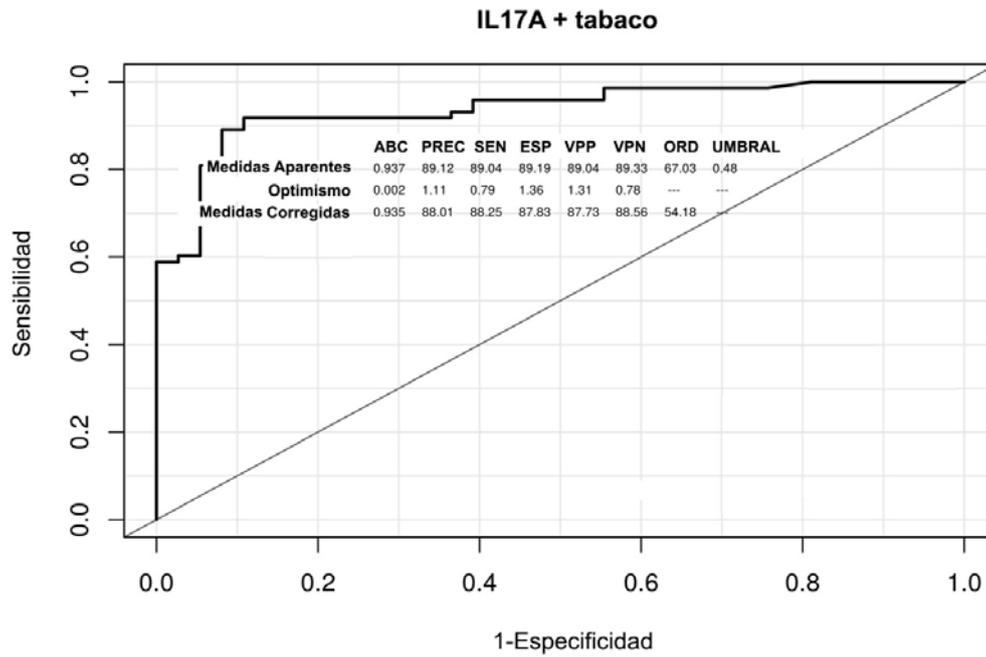
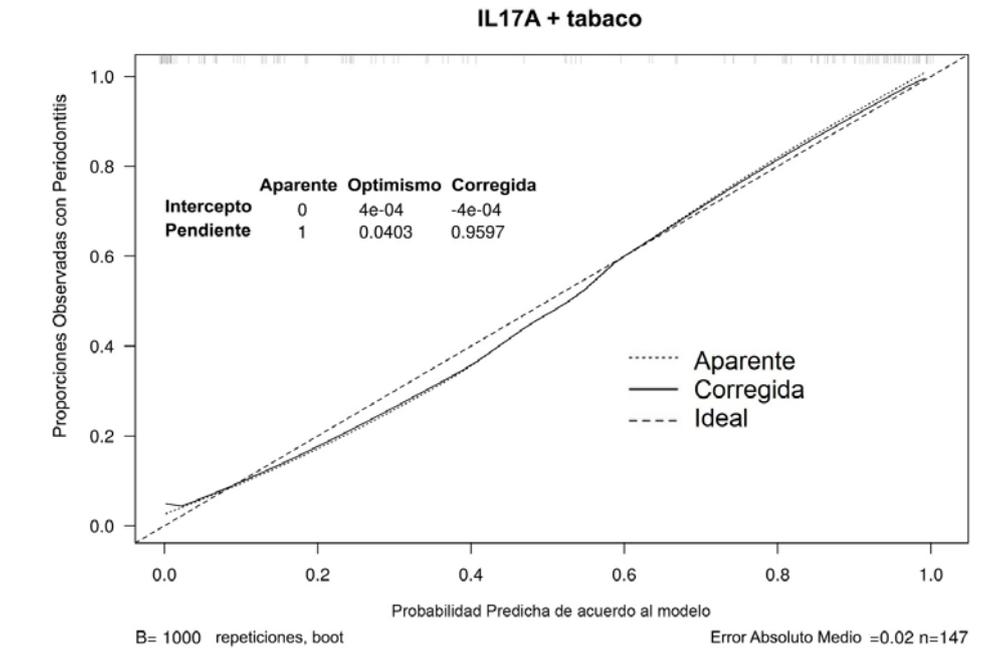
39. Kit según la reivindicación 37 y 38 en el que la información para el cálculo es proporcionada al usuario en cualquier formato, incluyendo las formas oral, escrita, gráfica, electrónica o a través de un software



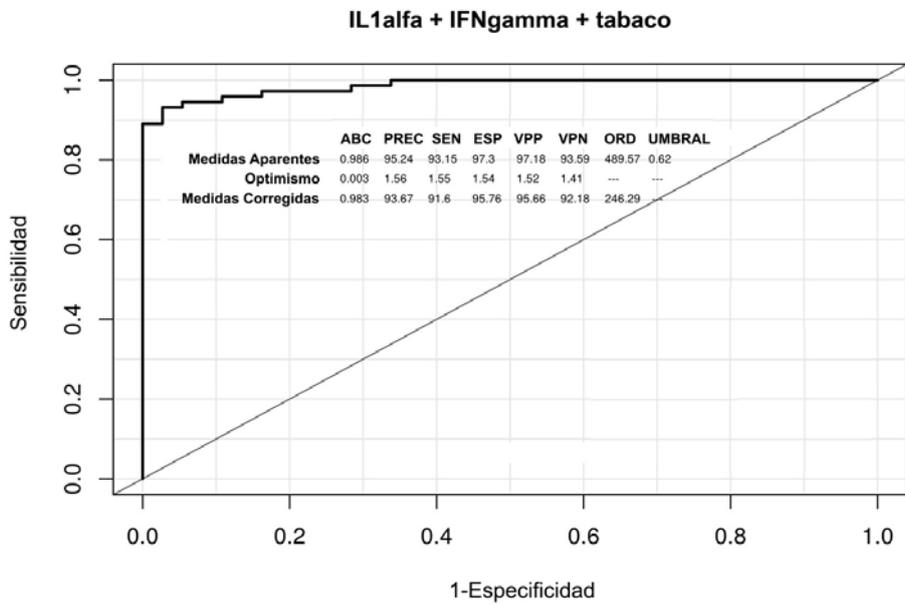
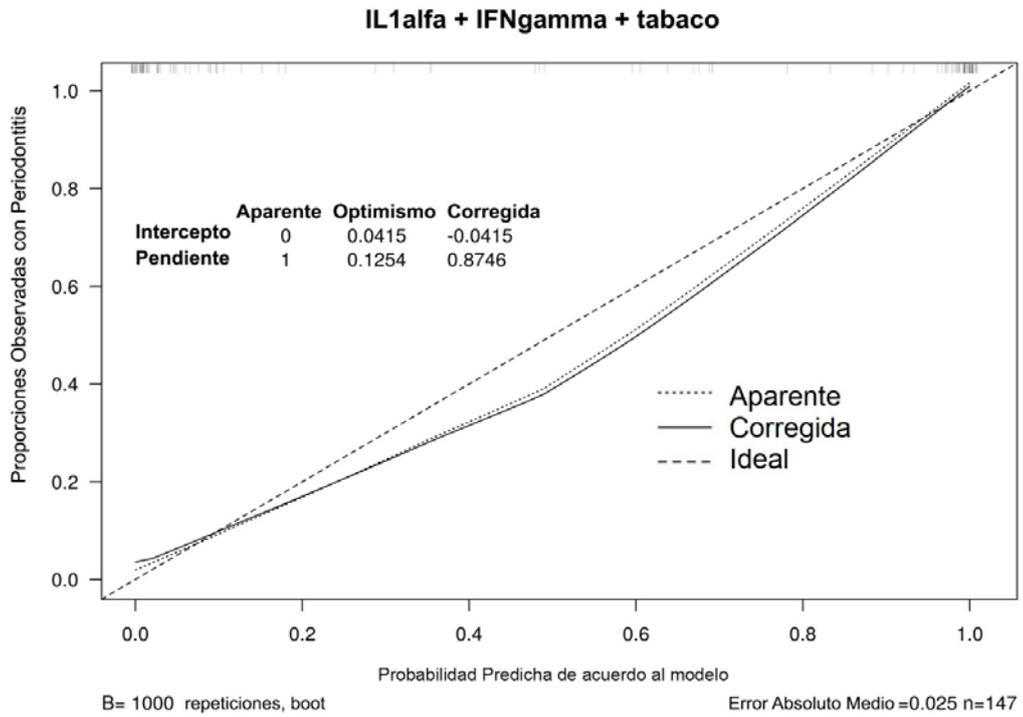
**FIG.1**



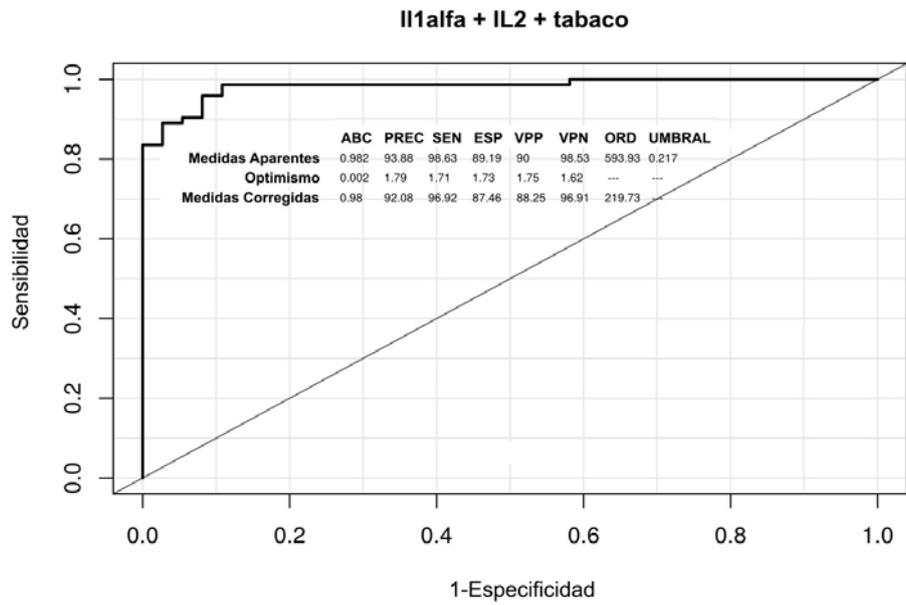
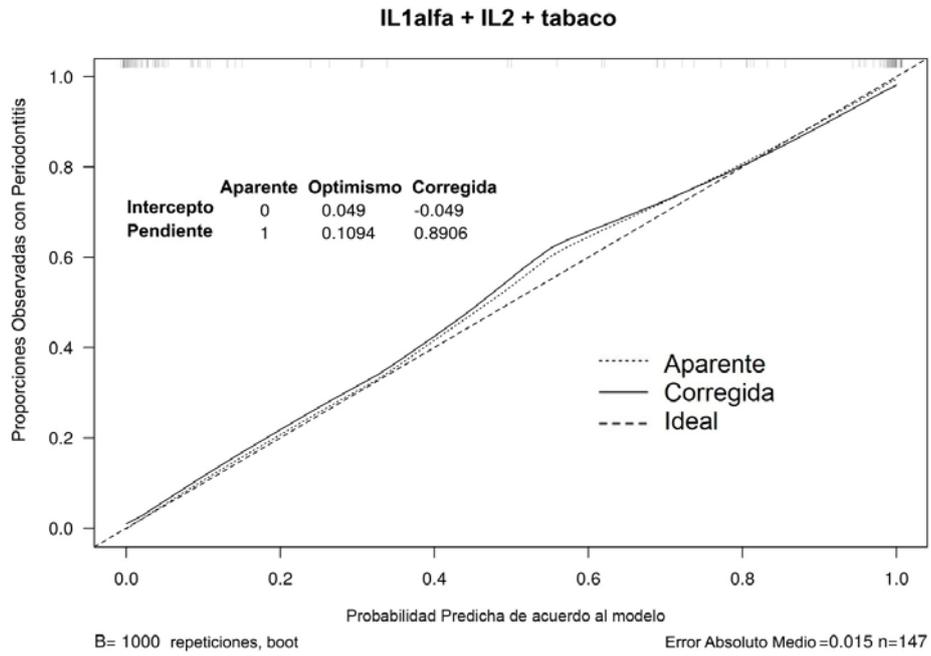
**FIG.2**



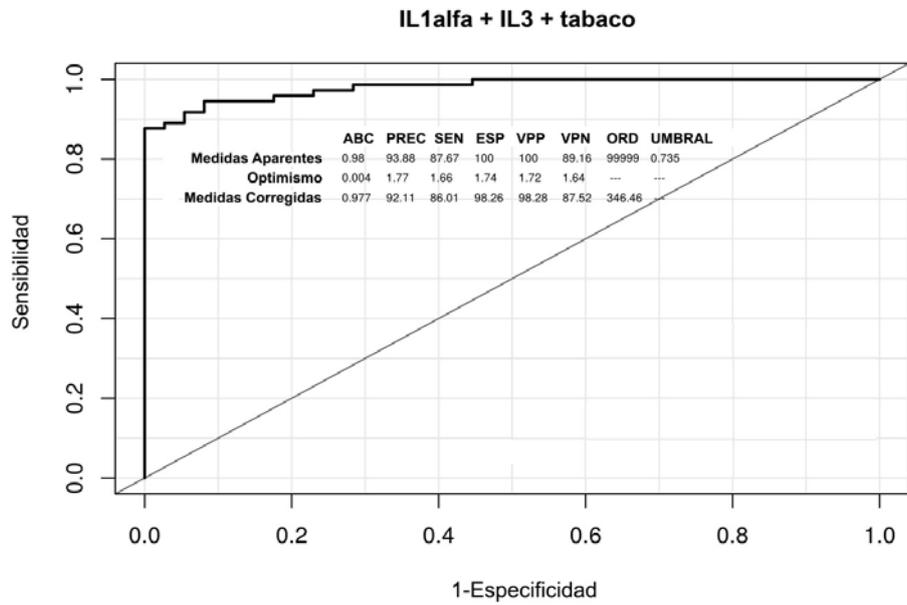
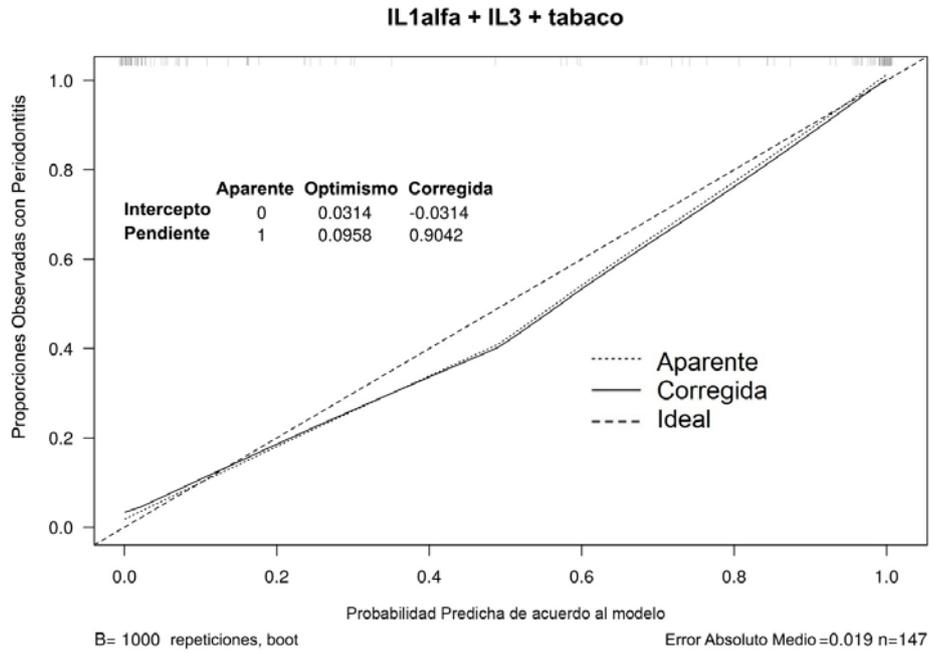
**FIG.3**



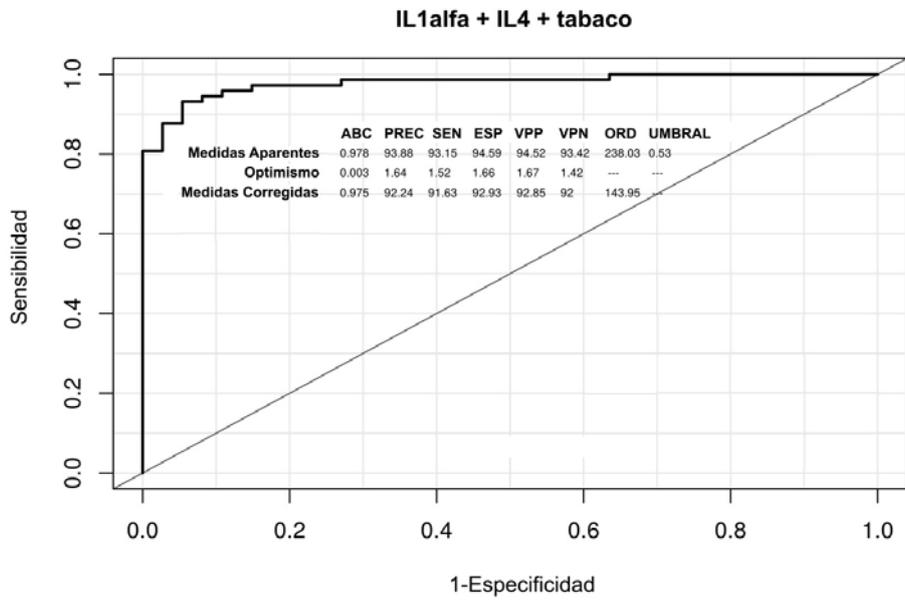
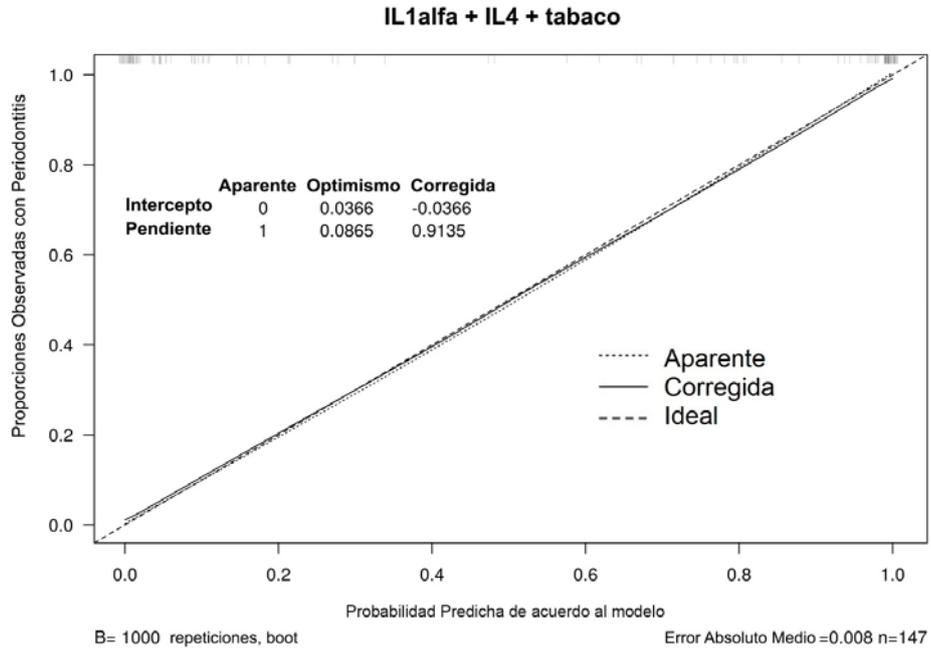
**FIG.4**



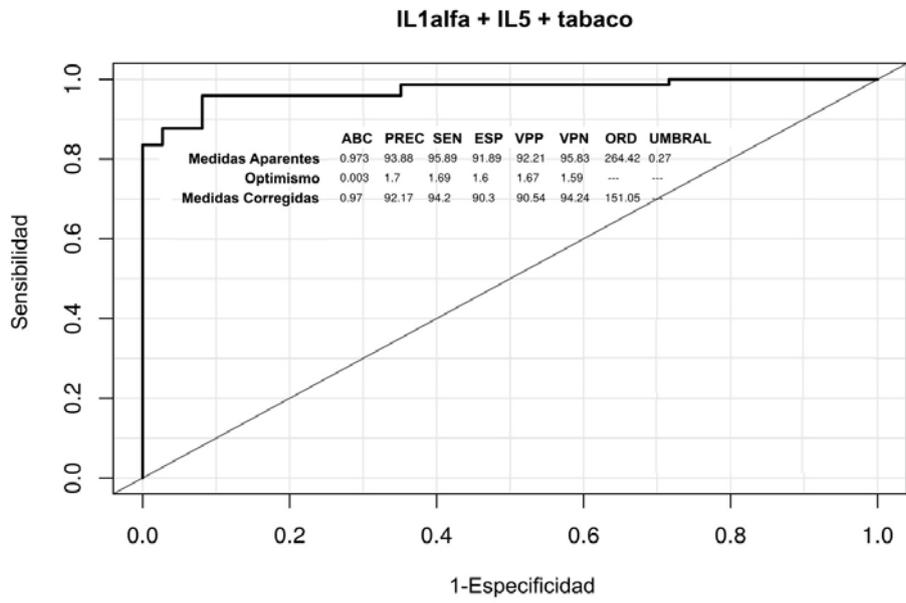
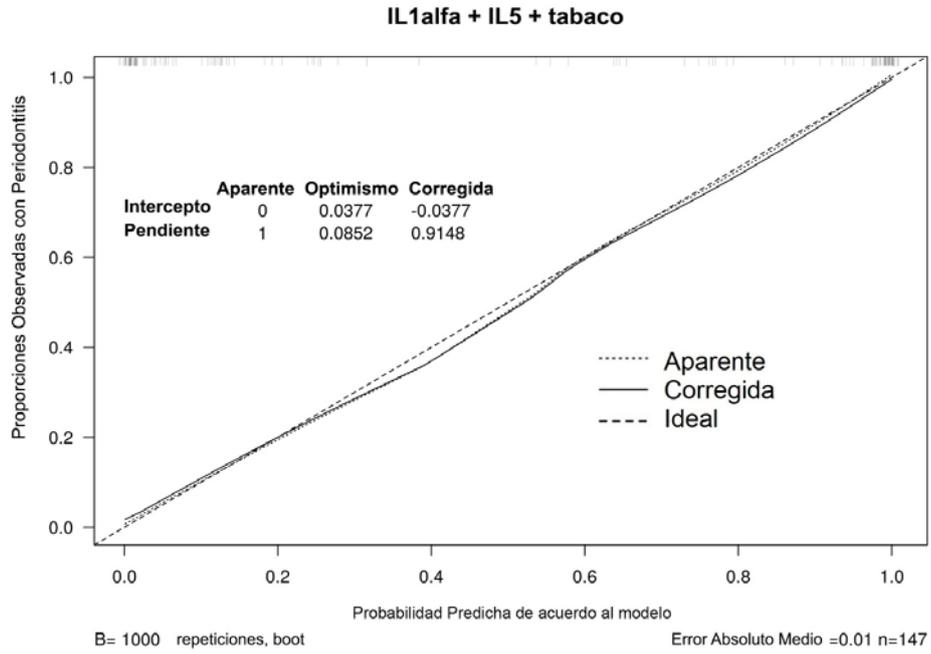
**FIG.5**



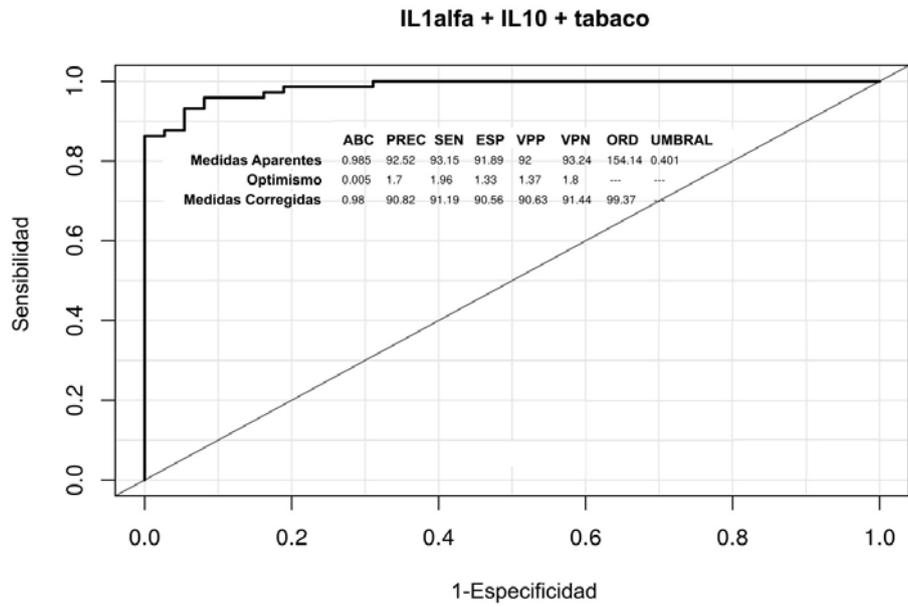
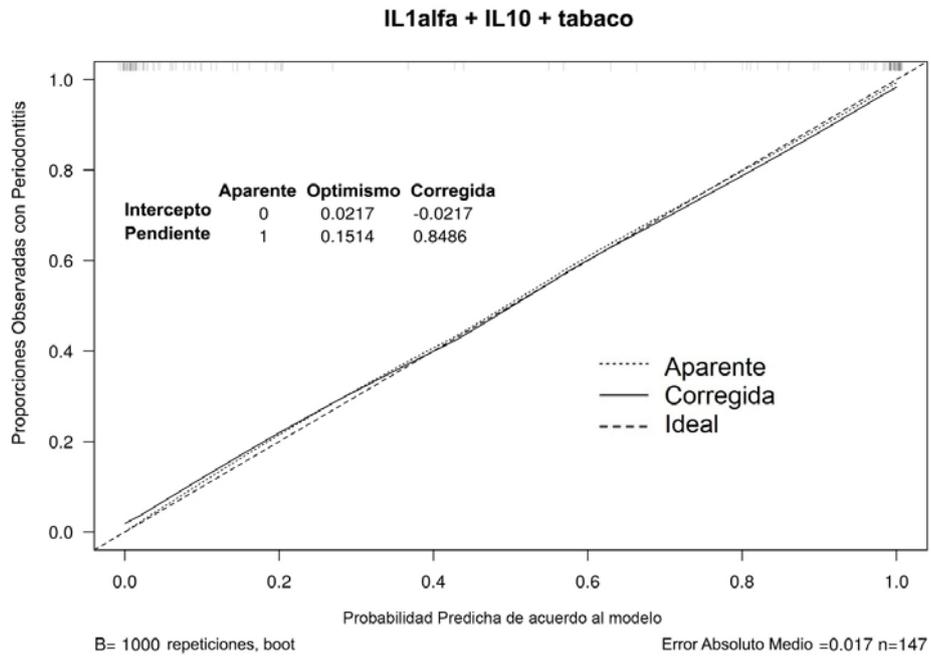
**FIG.6**



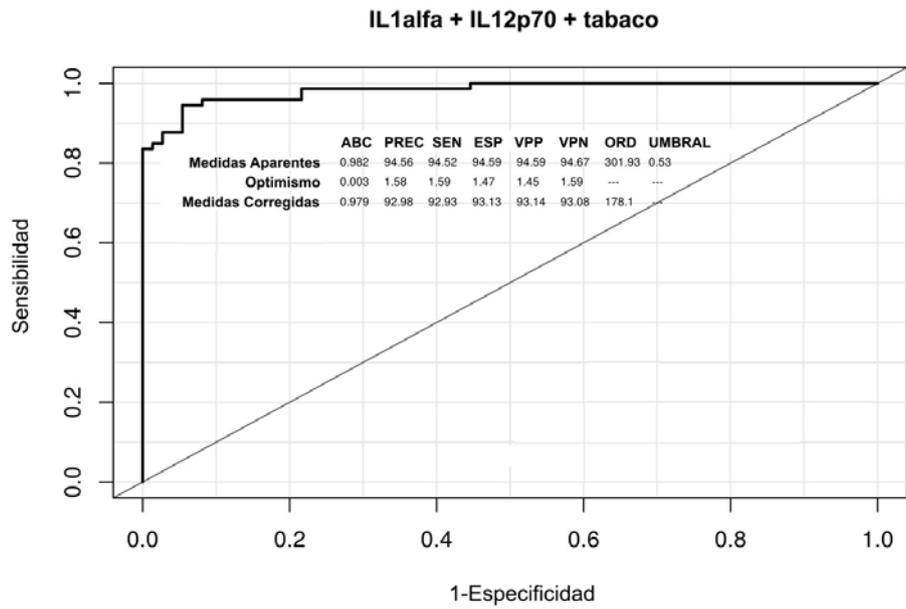
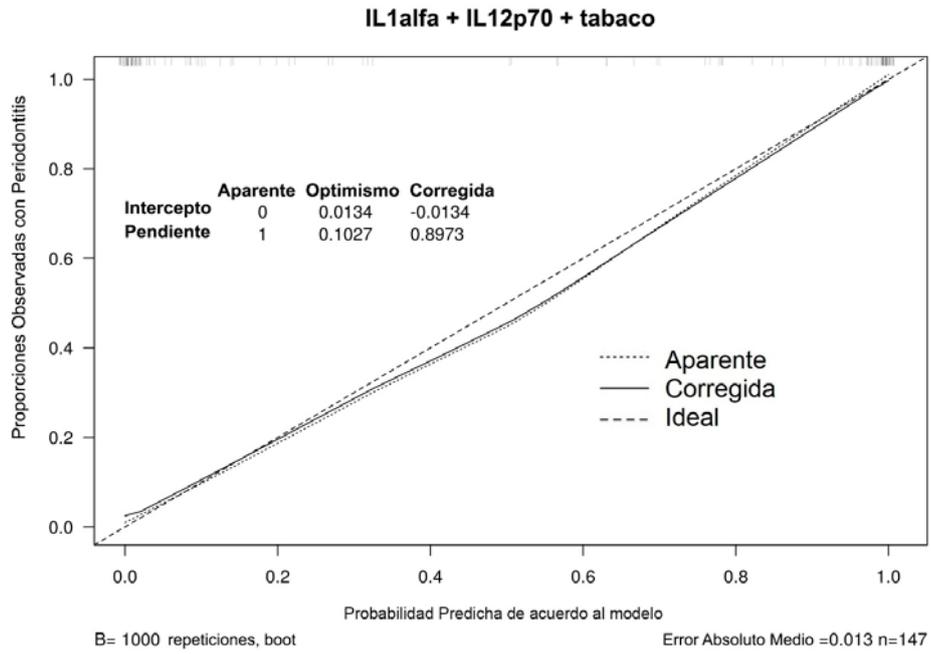
**FIG.7**



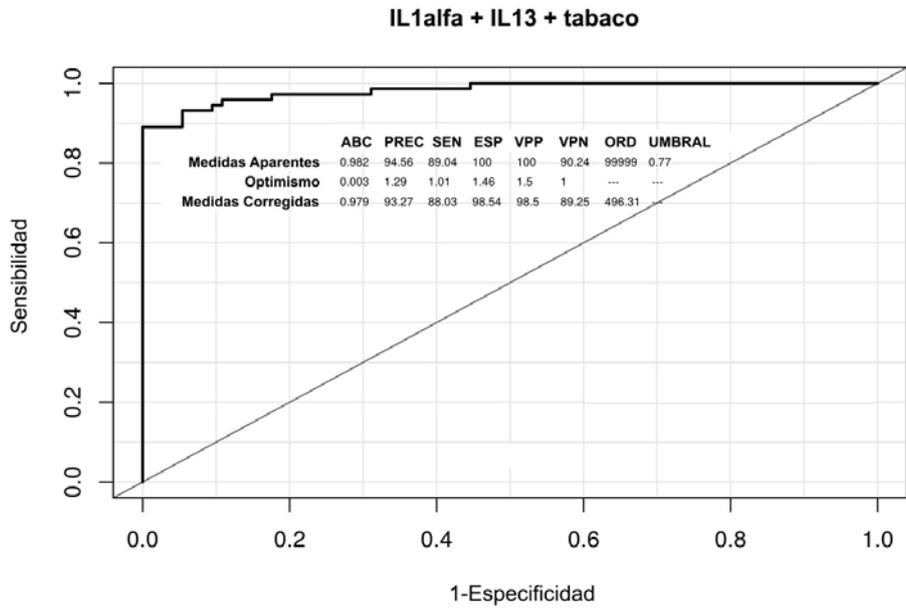
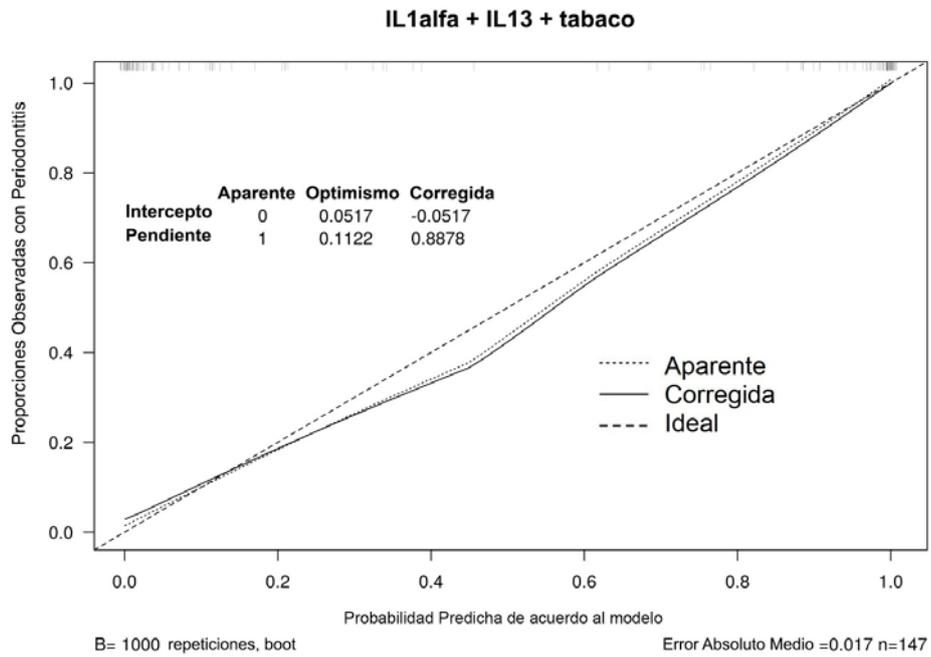
**FIG.8**



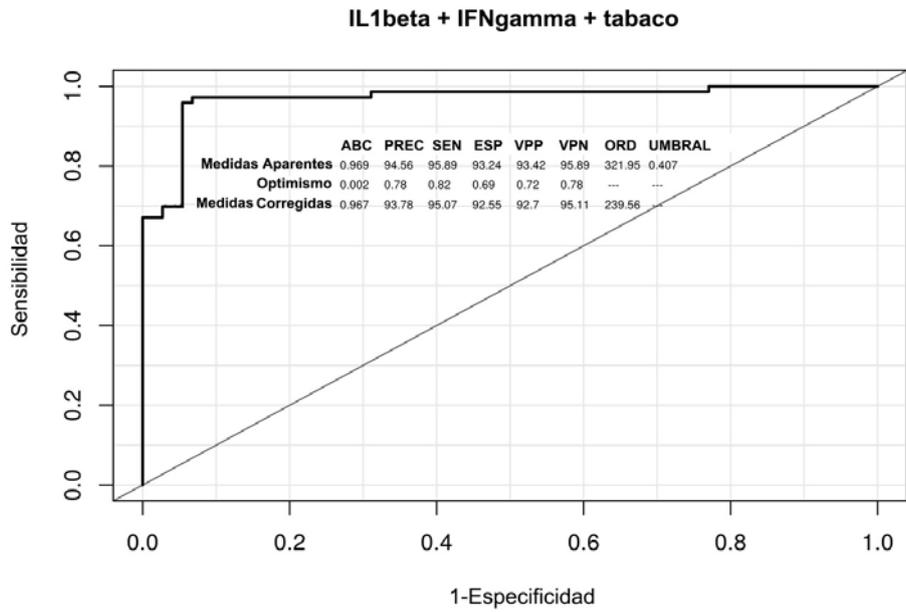
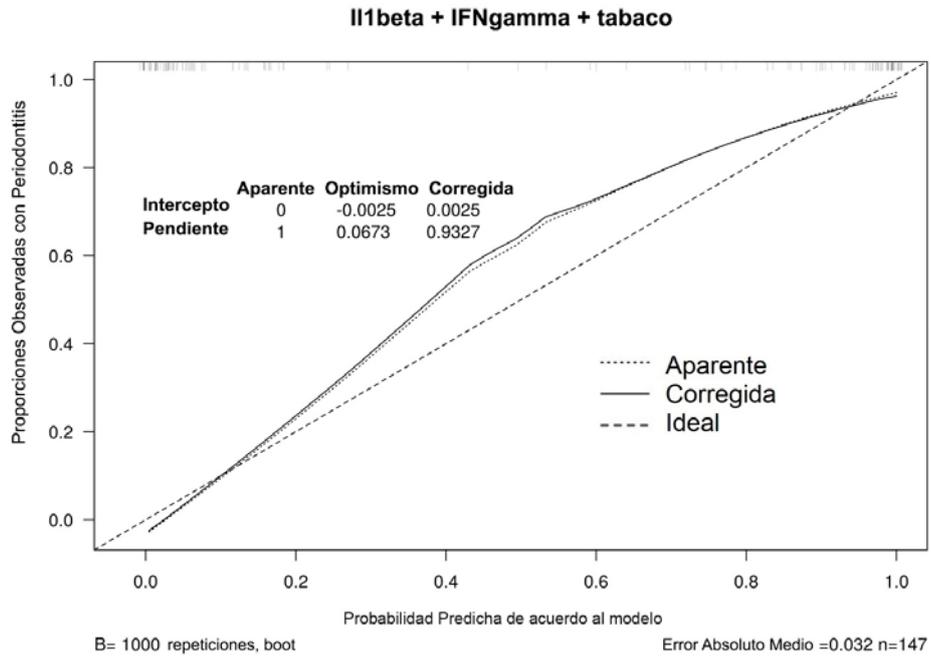
**FIG.9**



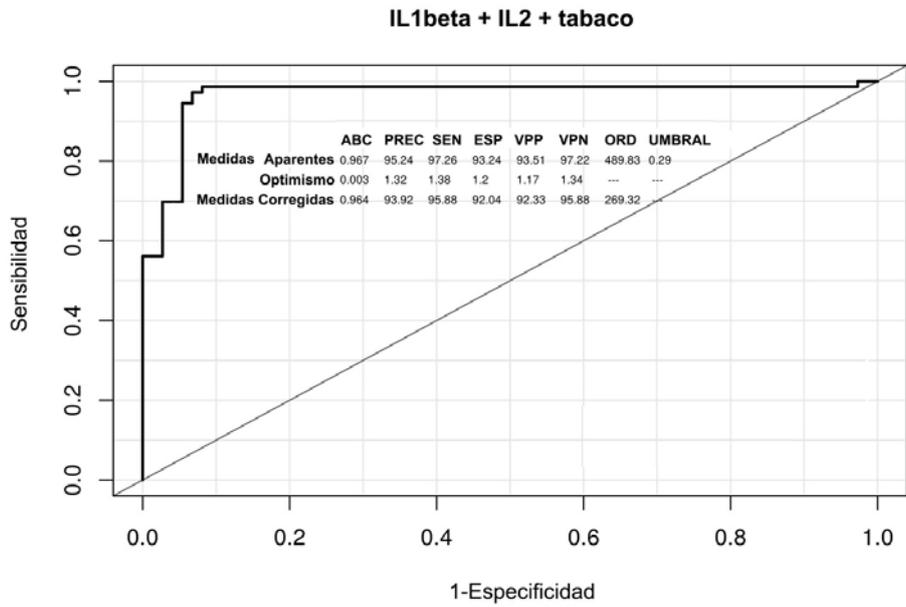
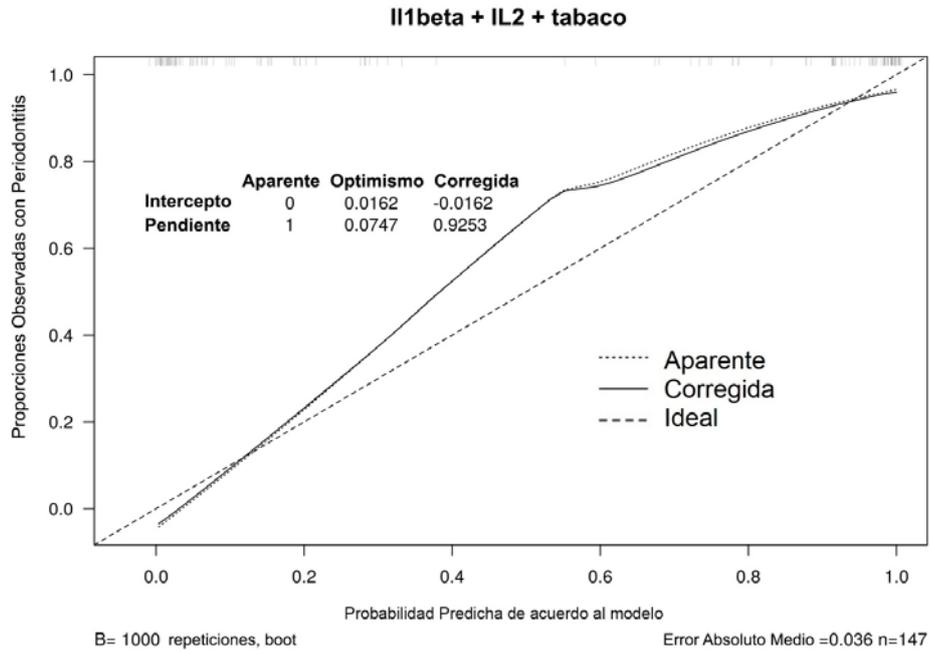
**FIG.10**



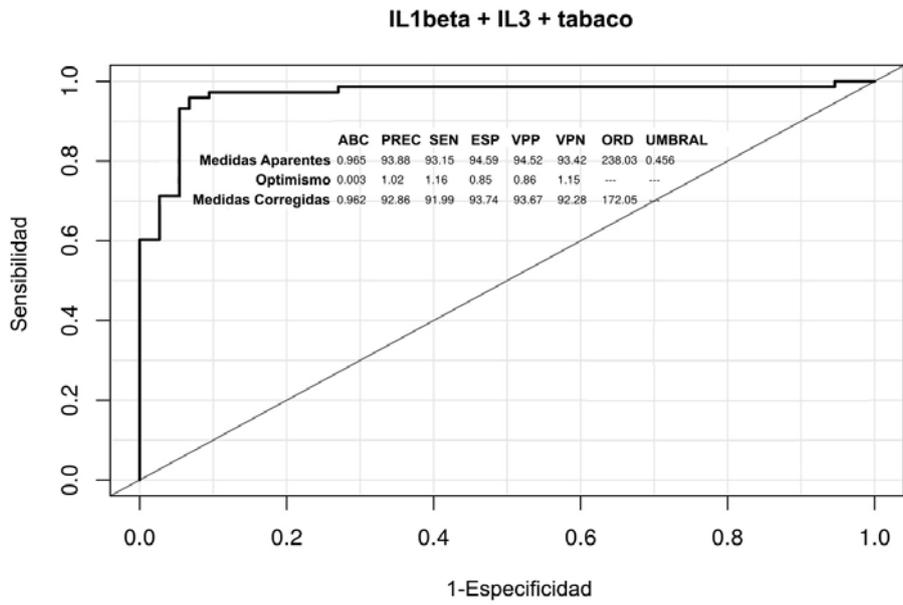
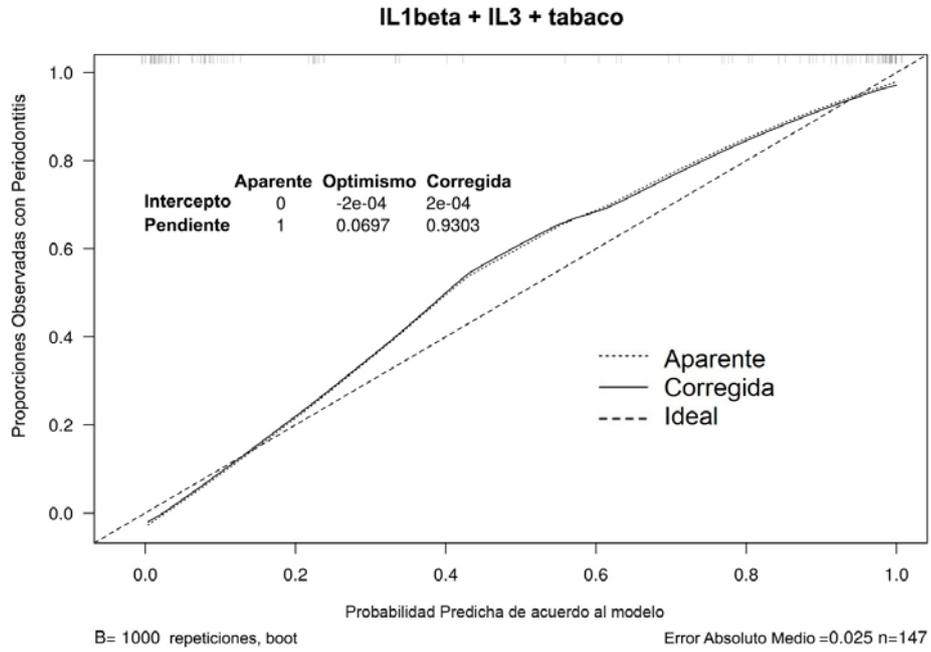
**FIG.11**



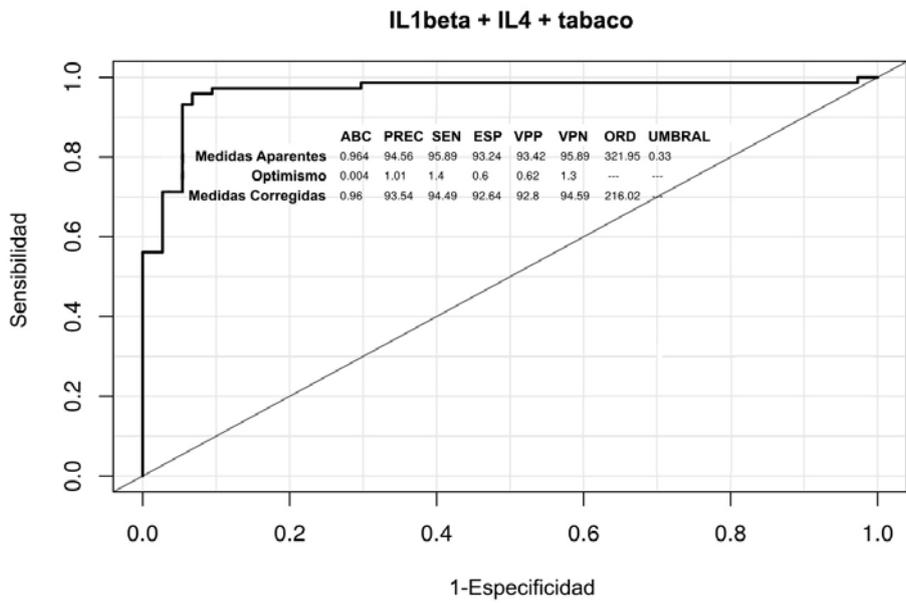
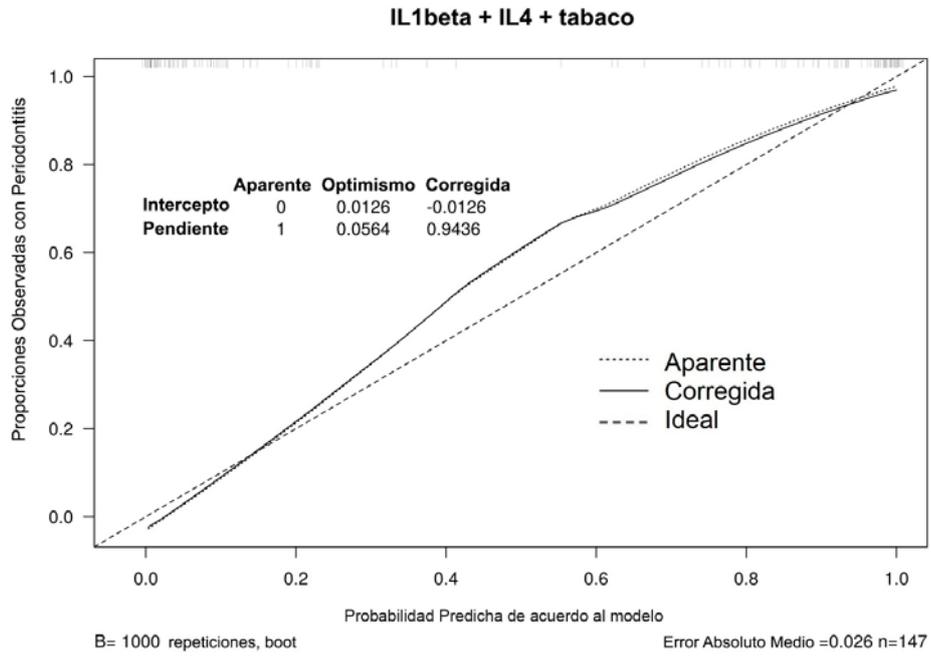
**FIG.12**



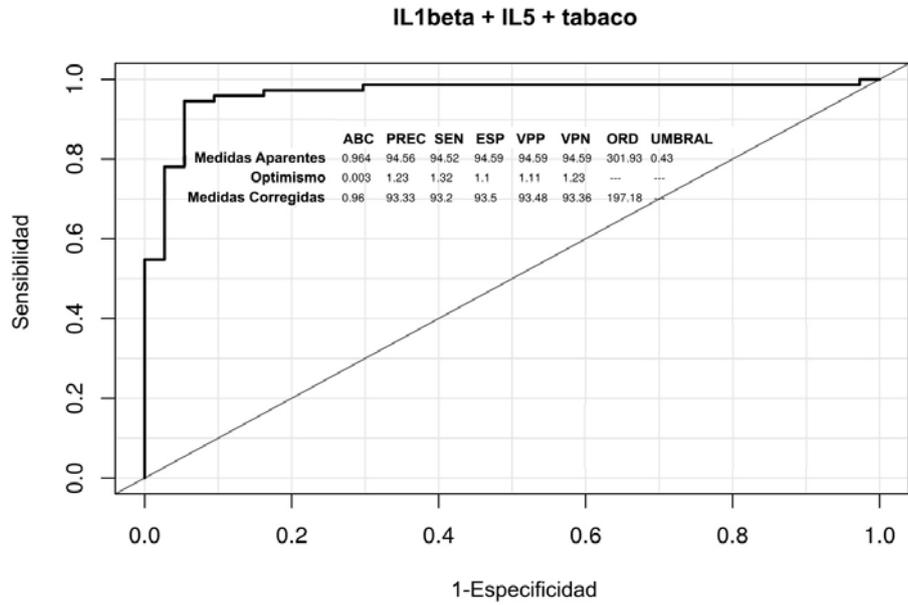
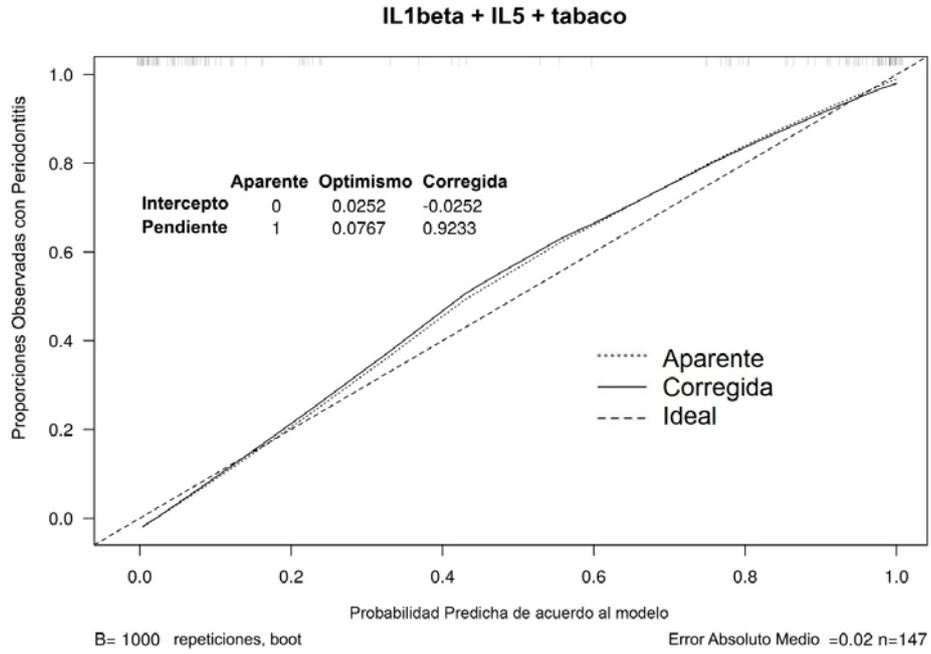
**FIG.13**



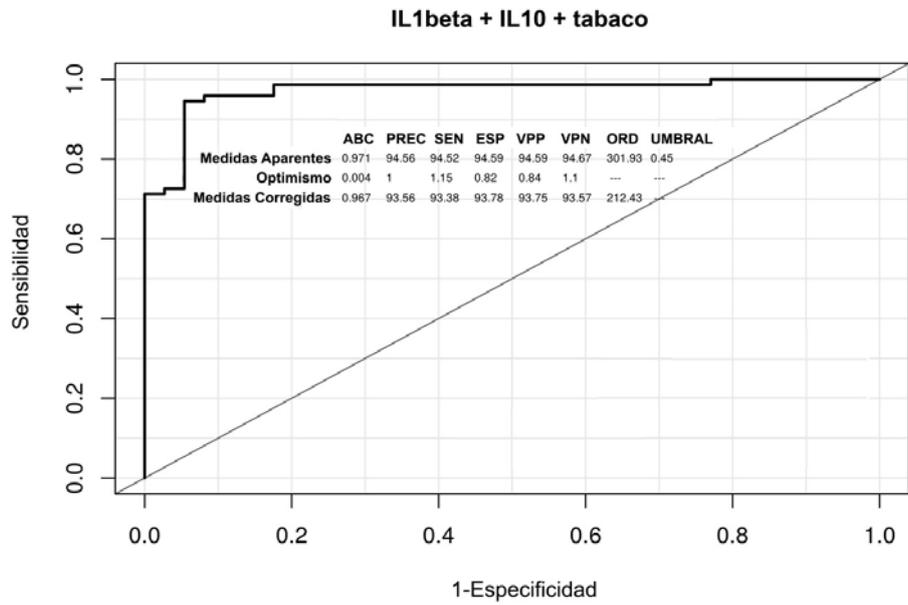
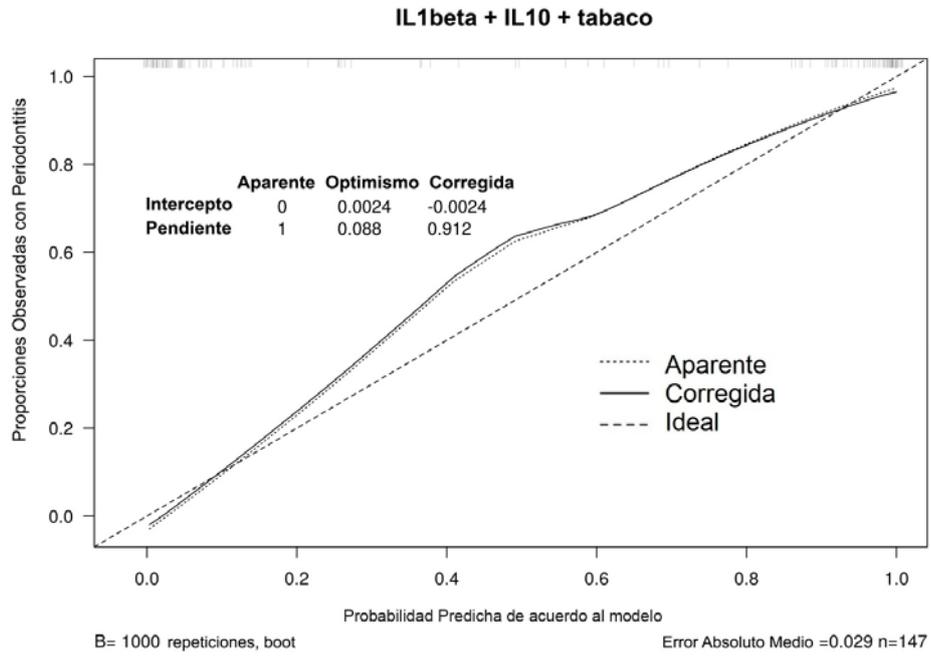
**FIG.14**



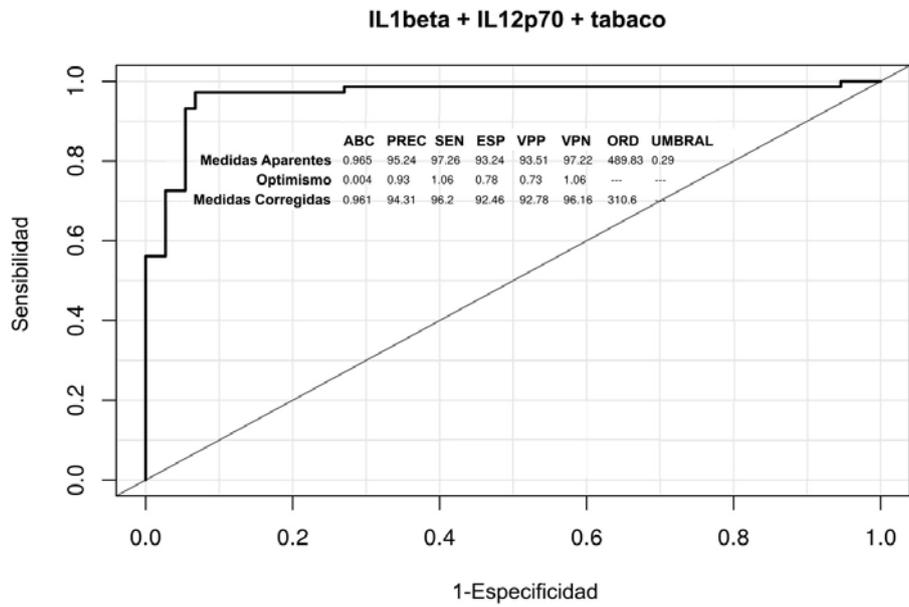
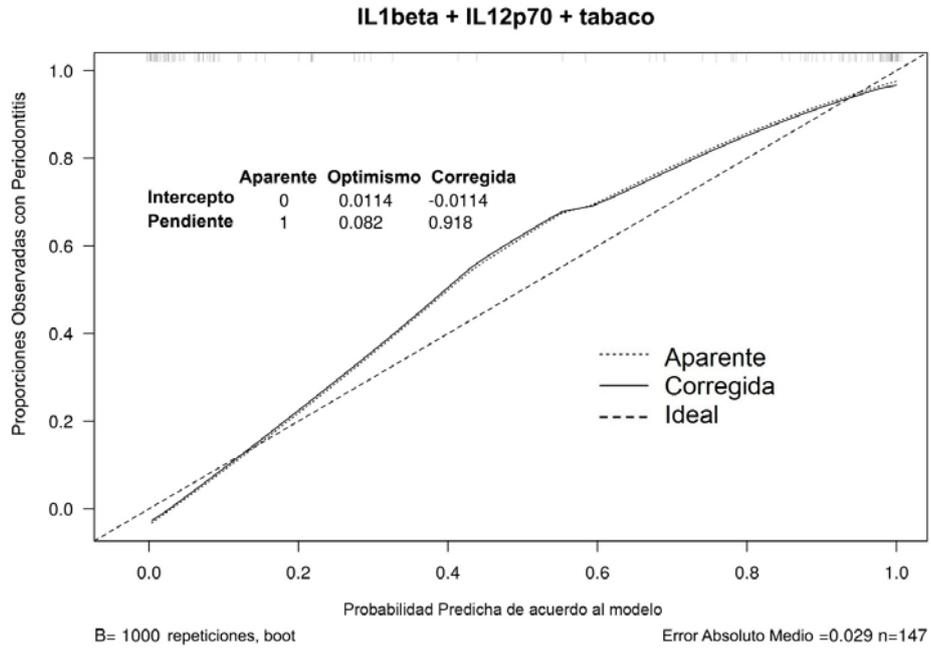
**FIG.15**



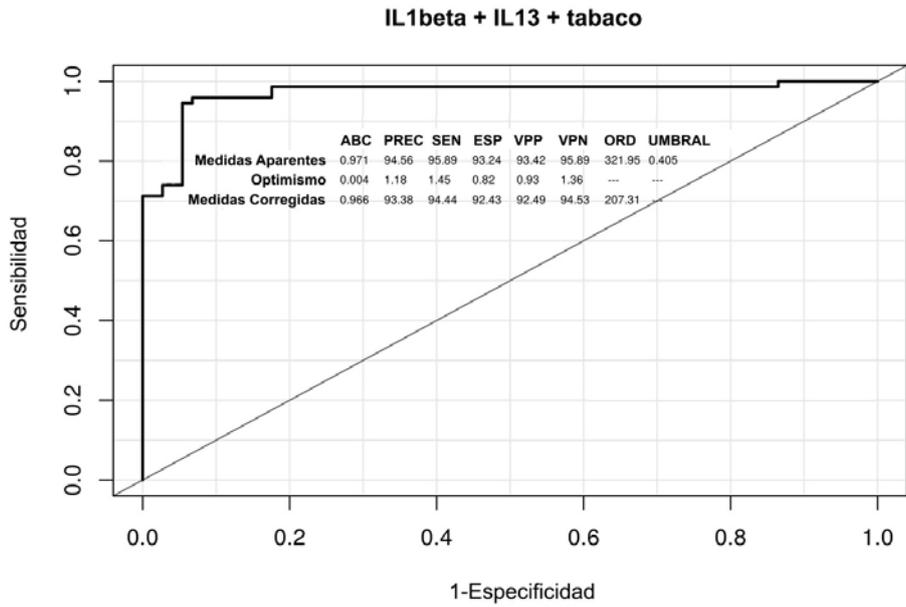
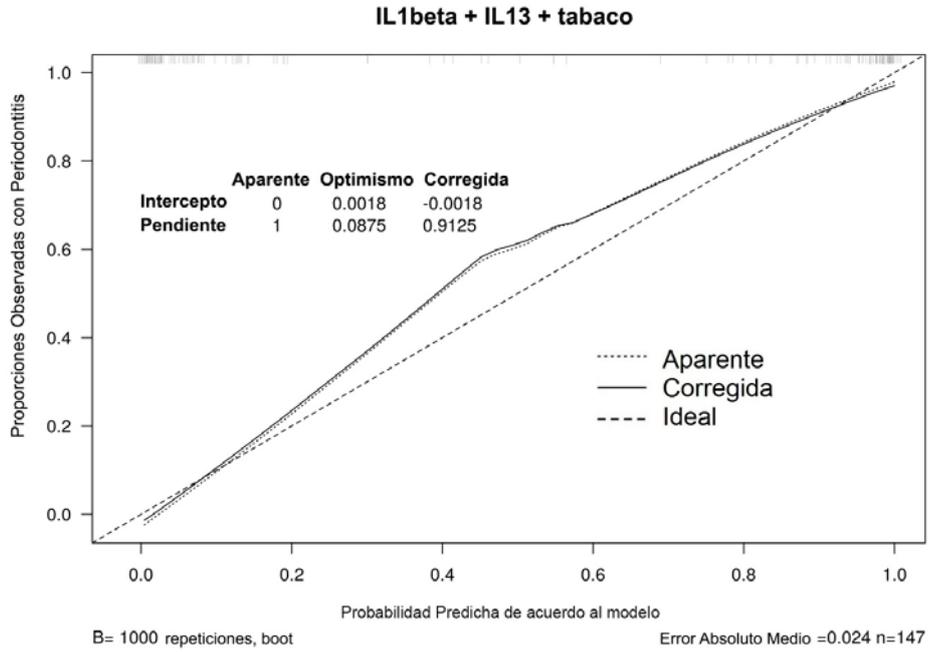
**FIG.16**



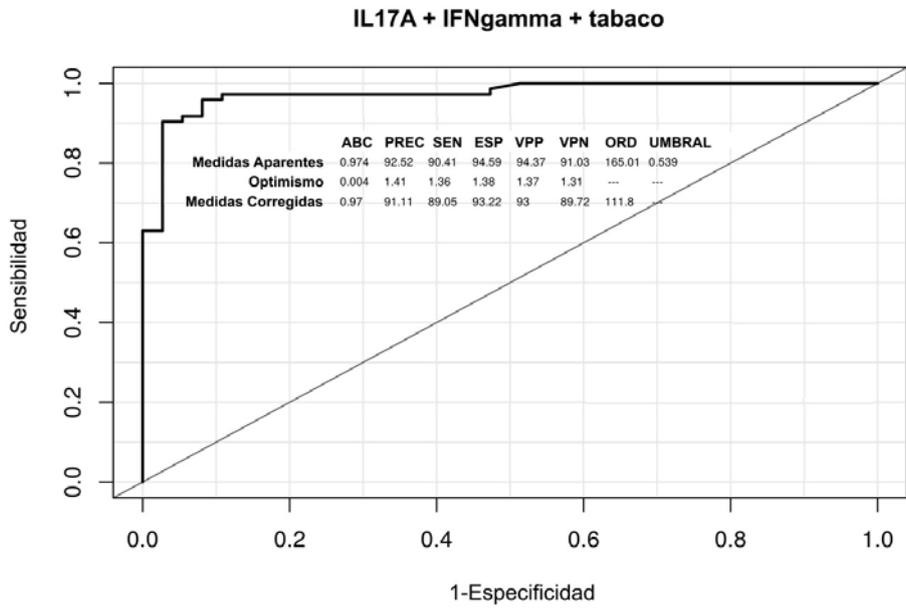
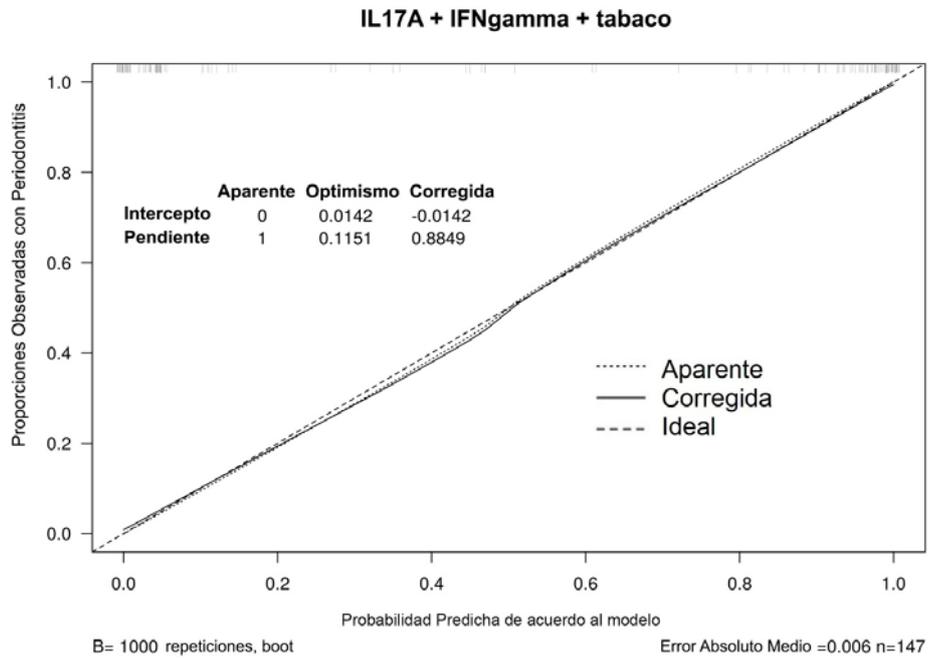
**FIG.17**



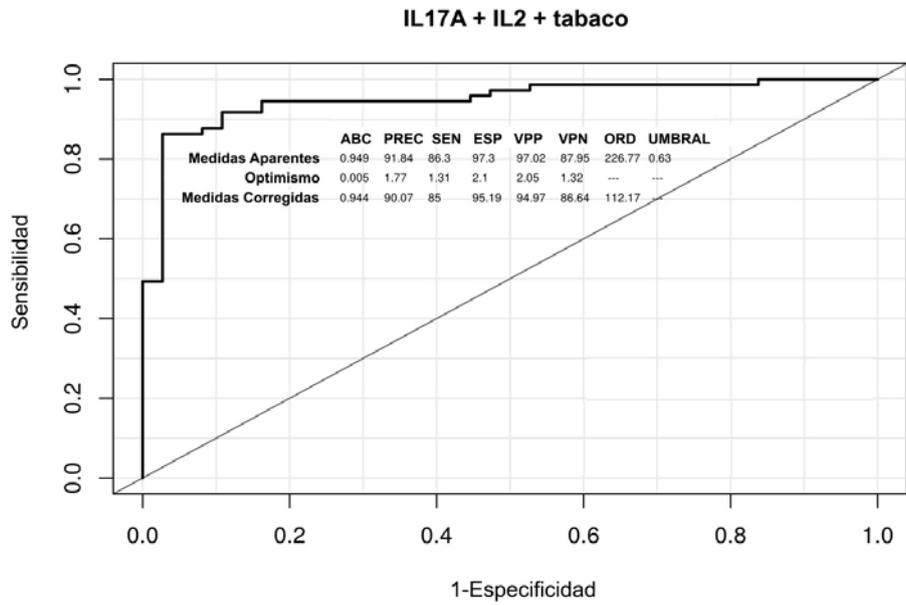
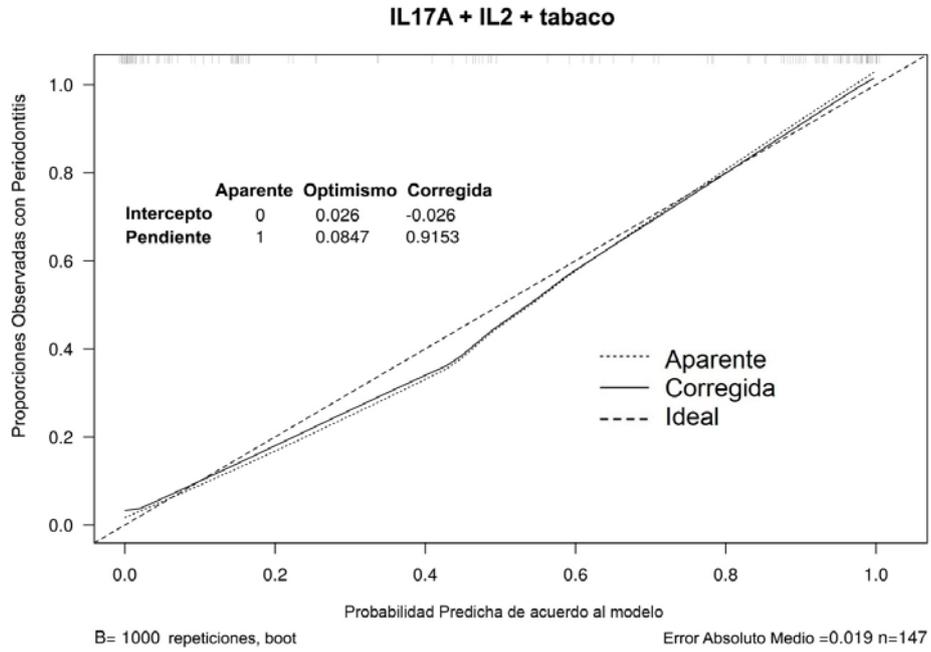
**FIG.18**



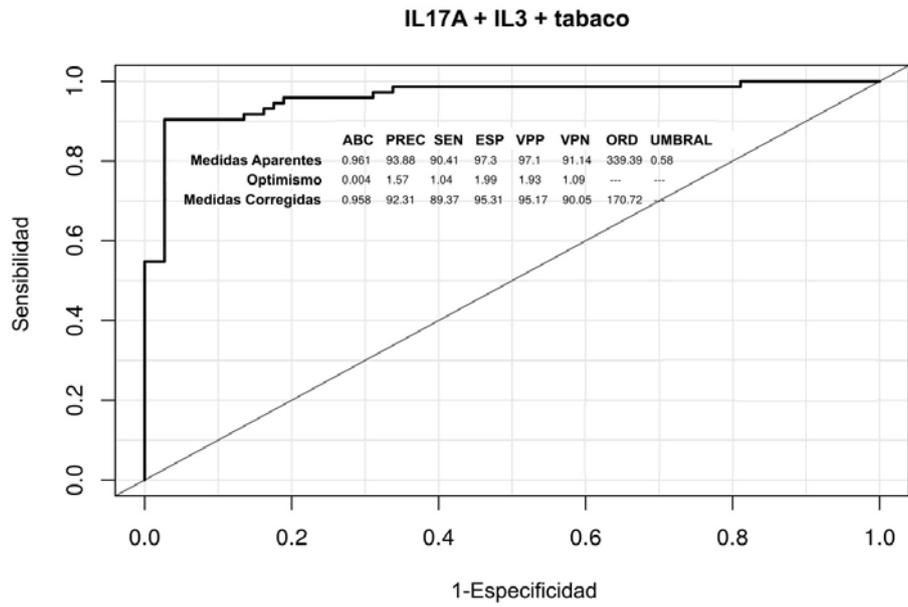
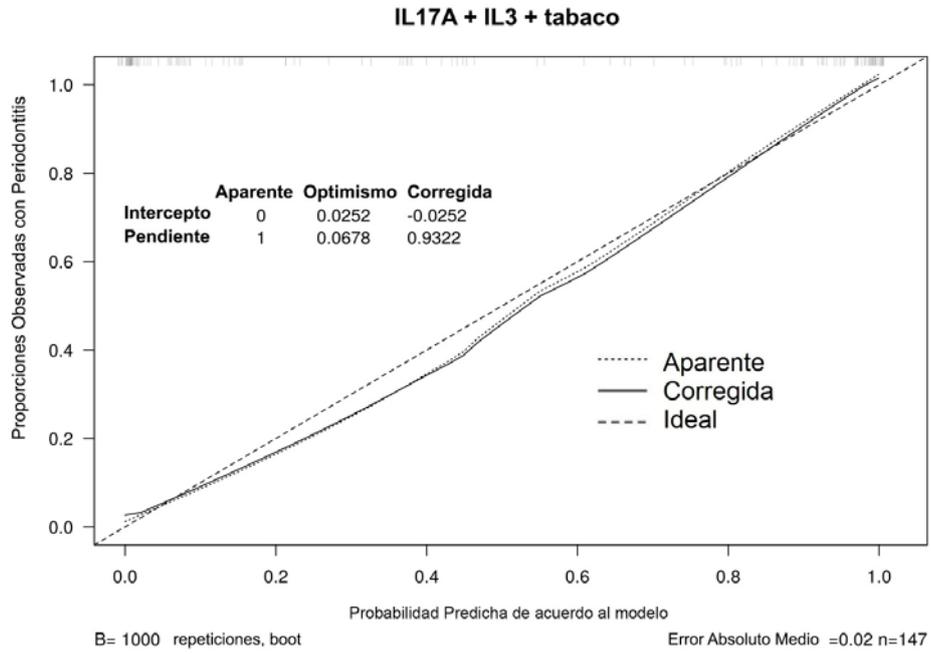
**FIG.19**



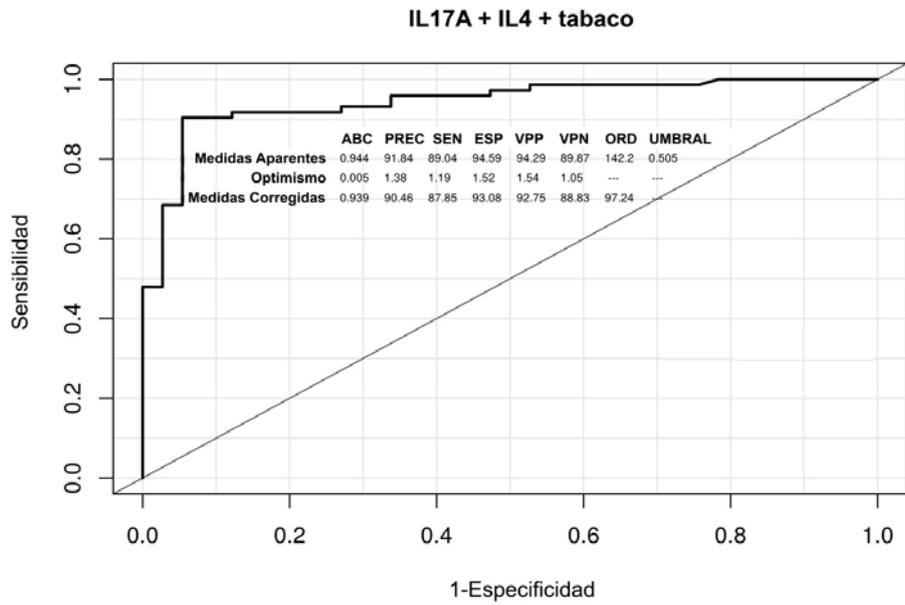
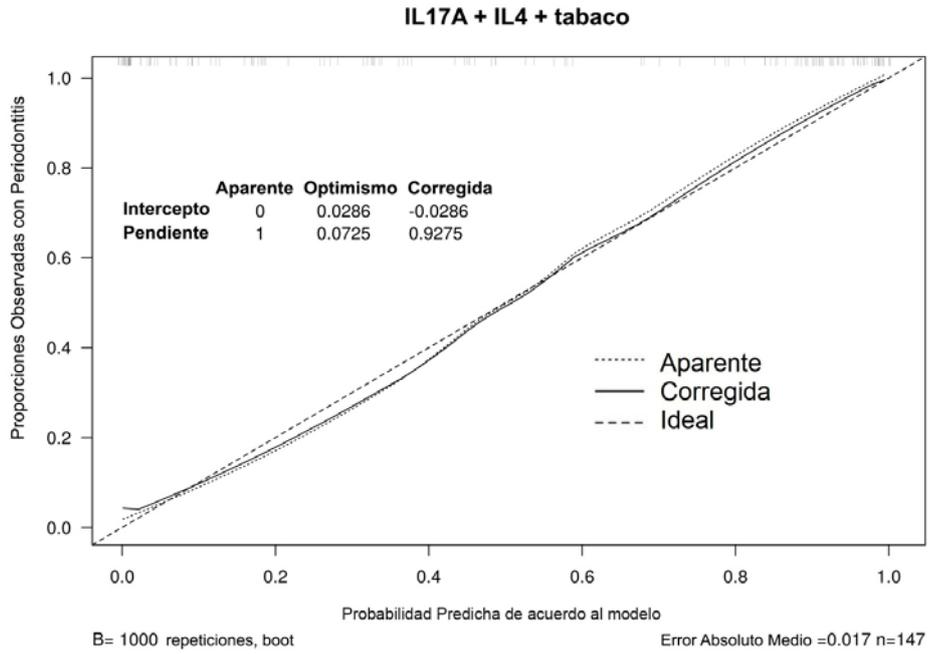
**FIG.20**



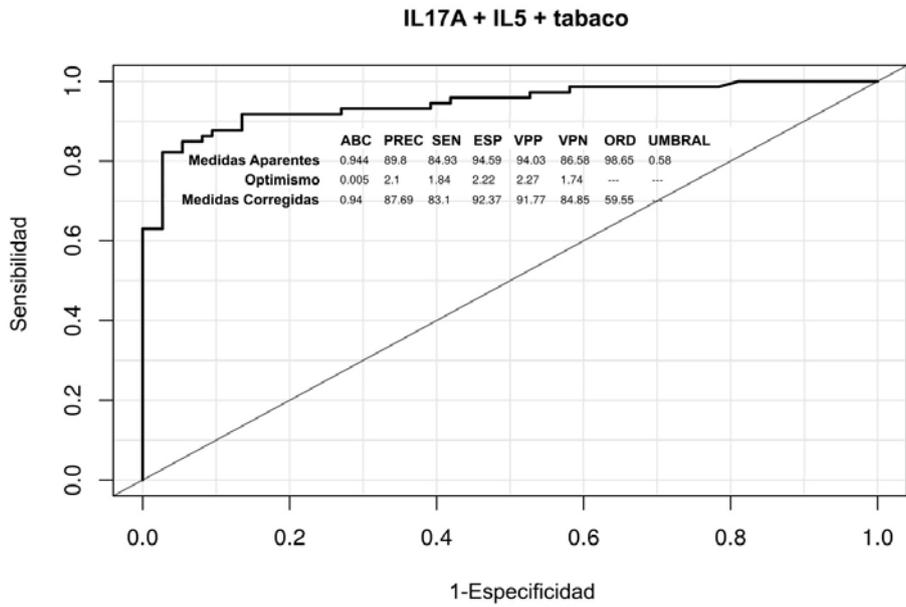
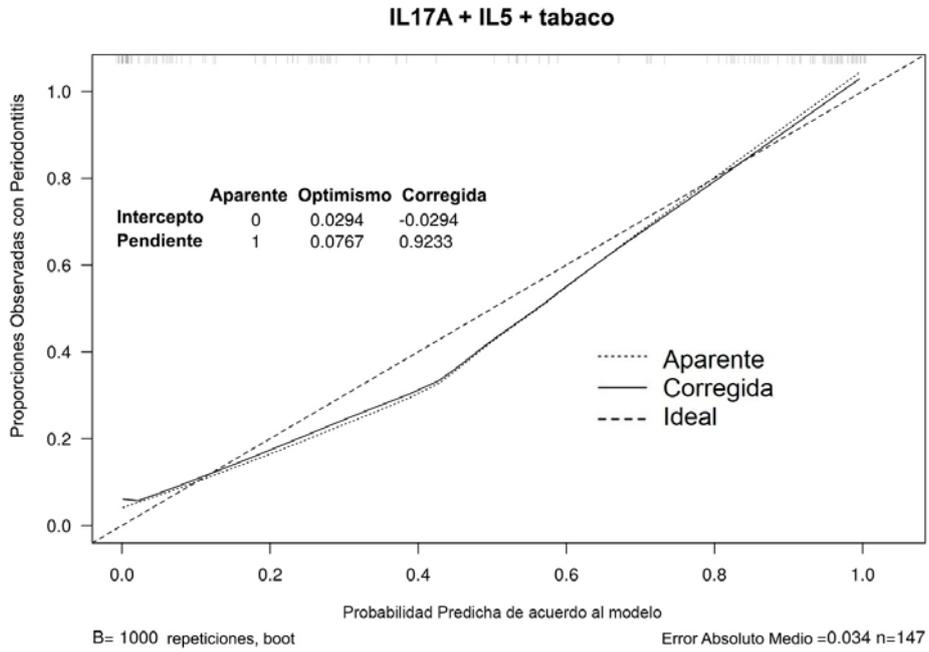
**FIG.21**



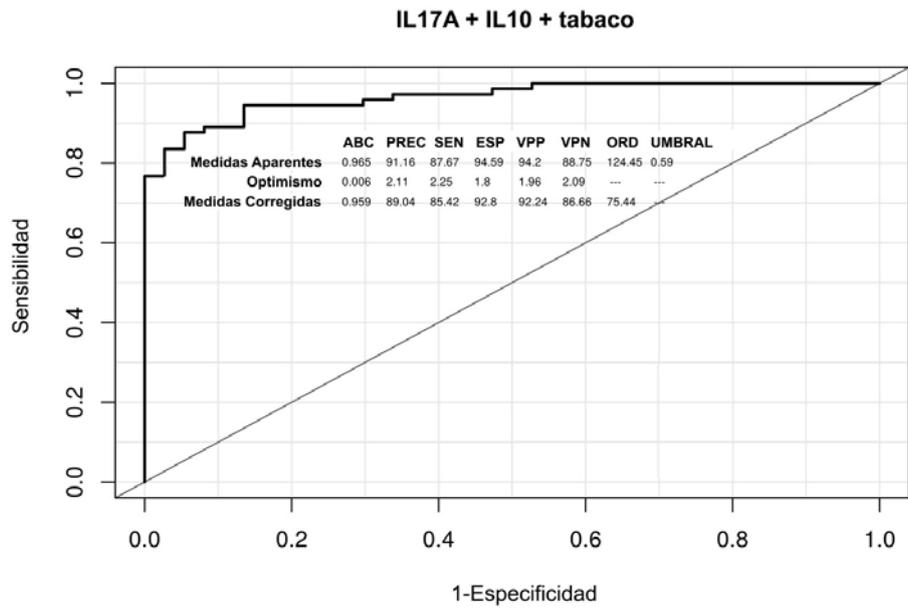
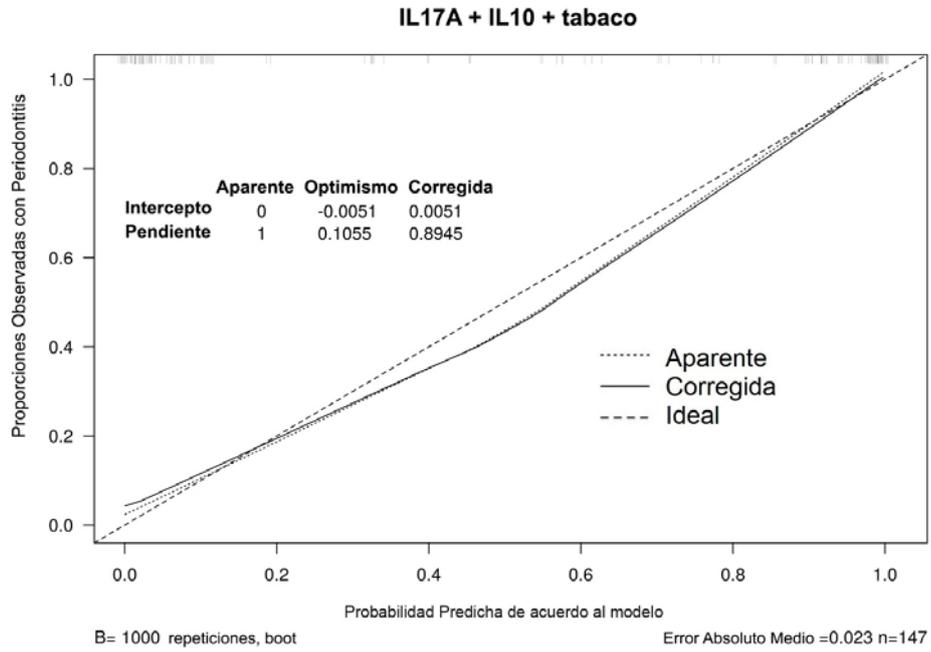
**FIG.22**



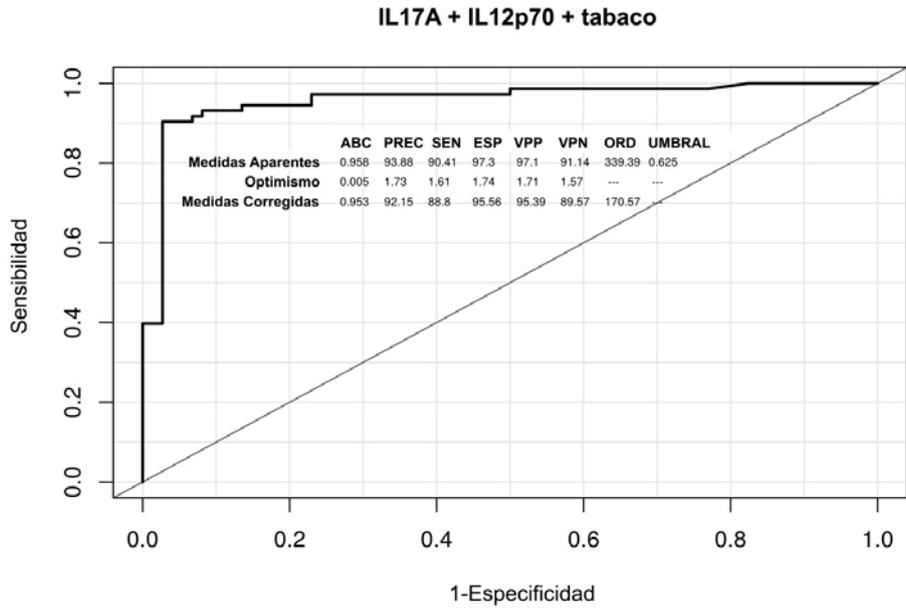
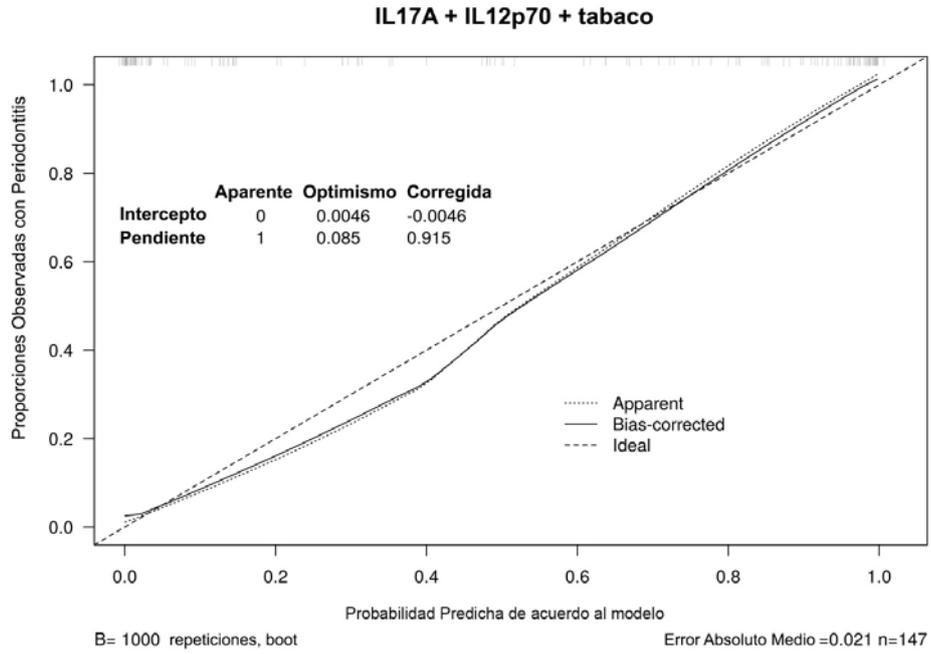
**FIG.23**



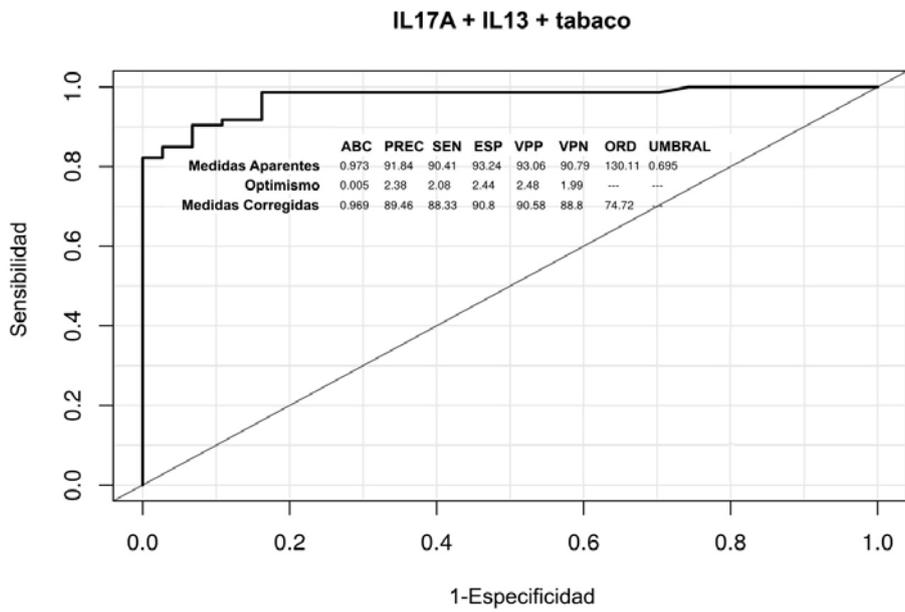
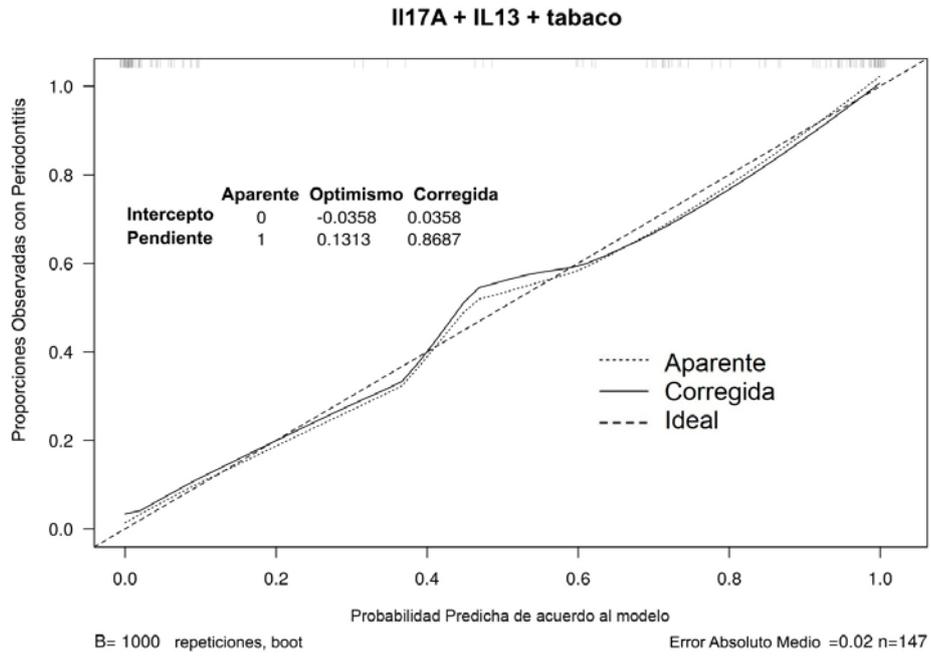
**FIG. 24**



**FIG. 25**



**FIG.26**



**FIG. 27**



②① N.º solicitud: 201730994

②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.07.2017

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/53** (2006.01)  
**G01N33/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GIANNOPOULOU JJ et al. Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress. Journal of Clinical Periodontology. 2004. Vol. 31, pp: 894-902, todo el documento.	1-39
X	BÖSTROM L. et al. Smoking and GCF levels of IL-1β and IL-1ra in periodontal disease. Journal of Clinical Periodontology. 2000. Vol. 27, pp: 250-255, todo el documento.	1-39
X	BÖSTROM L. et al. Smoking and crevicular fluid levels of IL-6 and TNFα in periodontal disease. Journal of Clinical Periodontology. 1999. Vol. 26, pp: 352-357, todo el documento.	1-39
A	US 5328829 A (STASHENKO PH.) 12.07.1994, columna 1, línea 50 – columna 2, línea 54.	1-39

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
21.02.2018

Examinador  
M. D. García Grávalos

Página  
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.