

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

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

31.07.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

31.01.2019

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

23.07.2020

Fecha de concesión:

27.10.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

04.11.2020

73 Titular/es:

**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:

Cito-periopredicador.

La presente invención se refiere al campo de métodos moleculares de diagnóstico y pronóstico para patologías. En concreto, se refiere a un procedimiento diagnóstico y pronóstico basado en un modelo predictivo multivariante generado a partir de los niveles de la combinación de citoquinas (IL1alfa e IFNgamma en fluido crevicular gingival para el diagnóstico de periodontitis crónica, su progresión y su respuesta a las diferentes intervenciones terapéuticas. En un ejemplo particular, estas combinaciones de citoquinas mostraron una excelente capacidad de discriminar (>=95%) la presencia de una periodontitis crónica con respecto a una situación de salud gingival/periodontal, así como porcentajes de precisión >=92% en la mayoría de las combinaciones.

ES 2 698 157 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

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 periodontitis crónica.

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 un modelo predictivo multivariante generado a partir de los niveles de una combinación compuesta de una citoquina pro-inflamatorias y una anti-inflamatoria en FCG para la predicción de periodontitis crónica, 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 una citoquina pro-inflamatoria (IL1alfa) combinada con una citoquina anti-inflamatoria (IFNgamma) muestra una excelente capacidad predictiva de la periodontitis crónica, con porcentajes de discriminación >95%, porcentajes de precisión $\geq 92\%$, así como porcentajes de sensibilidad y especificidad $\geq 90\%$.

30

Por tanto, esto permite el uso de un modelo predictivo multivariante basado en la combinación de dos citoquinas (una pro-inflamatoria y una anti-inflamatoria) y ajustado por el "hábito tabáquico", no solo como un método diagnóstico de la periodontitis crónica, sino también como método para predecir el pronóstico futuro de esta enfermedad así como la progresión clínica de la misma cuando un sujeto se acoge a una determinada actitud o recibe una determinada intervención terapéutica.

35

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

40

PRIMER MÉTODO. MÉTODO IN VITRO PARA DIAGNOSTICAR PERIODONTITIS CRÓNICA EN UN SUJETO

45

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método in vitro implementado por ordenador para diagnosticar periodontitis crónica en un sujeto, a continuación, en el presente documento, "el primer método de la invención", que comprende:

50

- a) Determinar el nivel de expresión de las citoquinas IL1alfa e IFN gamma en una muestra de fluido crevicular gingival del sujeto;
- b) Determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador en dicho sujeto.
- c) Aplicar el modelo predictivo multivariante:

$$-71,383 + 4,622 \times \text{IL1alpha} - 1,146 \times \text{IFNgamma} + 2,042 \times \text{tabaco};$$

55

- d) Obtener un valor de probabilidad asociado al nivel de expresión de las citoquinas que refiere la probabilidad de padecer una periodontitis crónica. Cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe una mayor certeza en el diagnóstico de periodontitis crónica. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de padecer o no una periodontitis crónica.

60

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

- 5 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).
- 10 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.
- 15 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.
- 20 El término de “salud 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 periodontales.
- 25 La primera etapa del primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión en un sujeto de dos citoquinas: IL1alfa e IFNgamma en una muestra de dicho sujeto.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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 es FCG. La muestra puede aislarse usando cualquier método convencional conocido en la técnica. En resumen, puede obtenerse muestras de FCG mediante puntas de papel superabsorbentes colocadas en el surco gingival o el empleo de micropipetas.
- 50 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.
- 55 60 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.
- 15 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.
- 20
- 25 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.
- 30
- 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.
- 35
- 40 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.
- 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 periodontitis crónica, 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 periodontitis crónica. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de padecer o no una periodontitis crónica.
- 45
- 50 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.
- 55 En una realización particular del primer método de la invención, se tiene como objetivo diagnosticar una periodontitis crónica utilizando los niveles de expresión de determinadas combinaciones de citoquinas pro-inflamatorias con citoquinas anti-inflamatorias.

En este 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.

5

SEGUNDO MÉTODO. MÉTODO PARA DETERMINAR EL RIESGO DE DESARROLLAR UNA PERIODONTITIS CRÓNICA EN UN SUJETO

10 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método in vitro implementado por ordenador para determinar el riesgo de desarrollar una periodontitis crónica en un sujeto, en adelante “el segundo método de la invención” que comprende:

- 15 a) Determinar el nivel de expresión las citoquinas IL1alfa e IFNgamma en una muestra de fluido crevicular gingival del sujeto.
- b) Determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador en dicho sujeto.
- 15 c) Aplicar el modelo predictivo multivariante:

$$-71,383 + 4,622 \times \text{IL1alpha} - 1,146 \times \text{IFNgamma} + 2,042 \times \text{tabaco};$$

- 20 d) Obtener un valor de probabilidad asociado al nivel de expresión de las citoquinas que refiere la probabilidad de riesgo de padecer en un futuro una periodontitis crónica. Cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe un mayor riesgo de padecer una futura periodontitis crónica. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de padecer o no la futura periodontitis crónica.

25 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 periodontitis crónica 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 periodontitis crónica 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 periodontitis crónica.

35 Los términos “sujeto”, “muestra” y “periodontitis crónica” se han definido previamente en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables en el segundo método de la invención.

40 En una realización particular, la muestra de dicho sujeto es de fluido crevicular gingival. Se han detallado métodos para obtener muestras de fluido crevicular gingival en el primer método de la invención.

40 En otra realización particular, la enfermedad es “periodontitis crónica” que se han definido previamente.

45 La primera etapa del segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de las citoquinas IL1alfa e IFNgamma en una muestra de dicho sujeto. Estos términos se han definido previamente en el primer método de la invención.

50 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 ambas citoquinas en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables al segundo método de la invención.

55 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.

60 La tercera etapa del segundo método de la invención comprende aplicar el modelo predictivo multivariante: $-71,383 + 4,622 \times \text{IL1alpha} - 1,146 \times \text{IFNgamma} + 2,042 \times \text{tabaco};$

La cuarta etapa del segundo método de la invención comprende obtener un valor de probabilidad , asociado al nivel de expresión de las citoquinas obtenido en el apartado a) de riesgo de desarrollar en un futuro una periodontitis crónica. En cuyo caso cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe mayor

riesgo de desarrollar en un futuro una periodontitis crónica. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de riesgo de padecer o no la futura periodontitis crónica. El término “valor de probabilidad” se ha definido previamente en el contexto del primer método de la invención.

5

TERCER MÉTODO. MÉTODO PARA DETERMINAR LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE UN SUJETO QUE PADECE UNA PERIODONTITIS CRÓNICA

10 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método in vitro implementado en ordenador para determinar la respuesta al tratamiento de un sujeto que padece una periodontitis crónica, a continuación, en el presente documento “el tercer método de la invención” que comprende:

- 15 a) Determinar el nivel de expresión de las citoquinas IL1alfa e IFNgamma en una muestra de fluido crevicular gingival;
- b) Determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador en dicho sujeto.
- 15 c) Aplicar el modelo predictivo multivariante:

$$-71,383 + 4,622 \times \text{IL1alpha} - 1,146 \times \text{IFNgamma} + 2,042 \times \text{tabaco};$$

- 20 d) Obtener un valor de probabilidad asociado al nivel de expresión de las citoquinas que refiere la probabilidad de una peor respuesta a un determinado tratamiento clínico en un paciente con periodontitis crónica 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.

25 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.

30

El término “terapia” tal y como se presenta en este documento, se refiere a un protocolo de actuación para el tratamiento de una periodontitis crónica, el cual implica la utilización de fármacos y agentes antimicrobianos y la práctica de determinadas maniobras.

35

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.

40

Los términos “sujeto”, “muestra” y “periodontitis crónica” se han definido previamente en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables en el tercer método de la invención.

45 En una realización particular, la muestra de dicho sujeto se obtiene de fluido crevicular gingival. Se han detallado métodos para obtener muestras de este tipo en el primer método de la invención.

50 La primera etapa del tercer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión en un sujeto de las citoquinas IL1alfa e IFNgamma en una muestra de fluido crevicular gingival. Estos términos se han definido previamente en el primer método de la invención.

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

55

Se han detallado métodos para determinar los niveles de expresión de ambas citoquinas en el contexto del primer método de la invención y son igualmente aplicables al tercer método de la invención.

60 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.

La tercera etapa del tercer método de la invención comprende obtener un valor de probabilidad, mediante el modelo predictivo multivariante: $-71,383 + 4,622 \times IL1\alpha - 1,146 \times IFN\gamma + 2,042 \times \text{tabaco}$;

5 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. El término “valor de probabilidad” se ha definido previamente en el contexto del primer método de la invención.

10 Una vez se realizan las cuatro 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 periodontitis crónica.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

Figura 1. Gráfico de calibración y curva ROC del modelo basado en IL1alfa, IFNgamma y “hábito tabáquico”.

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

20

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

Ejemplo 1. Pacientes y sujetos control

25

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 (Universidad 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.

50

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).

55

Ejemplo 2. Análisis estadístico: Comparación de las características clínicas entre los dos grupos de estudio (controles con salud periodontal y pacientes con periodontitis crónica)

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 $P < 0,05$.

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

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
Edad (años)	45,65 (12,37)	51,12 (10,01)	0,005
Género			
Varones	31	31	NS
Mujeres	43	42	
Hábito tabáquico¹			
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
Número de dientes	26,72 (3,25)	25,55 (4,00)	NS
Boca completa			
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
Localizaciones muestreadas			
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 hacía más de 5 años.

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

5 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 super-absorbente (Periopaper, Amityville, NY, USA) se insertó en el surco gingival o bolsa periodontal durante 10 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 15 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 20 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.

25 **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: 30 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 35 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.

40 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.

45 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 50 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, 55 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.

5 **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**

10 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.

15 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 $P < 0,05$.

20 **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**

25 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).

30 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).

40 **Tabla 2.** Concentraciones (log₂ 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 P (U Mann- Whitney)	OR	IC 95%		Valor P (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

Citoquina	Concentración (log ₂ pg/ml) Mediana (RIQ)		Valor P (U Mann- Whitney)	OR	IC 95%		Valor P (OR)
	Grupo Control	Grupo Perio			Inferior	Superior	
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

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

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.

10 **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 diferente papel etiopatogénico que ejercen las citoquinas pro-inflamatorias con respecto a las anti-inflamatorias.

20 Los modelos se construyeron seleccionando inicialmente una citoquina pro-inflamatoria como variable predictor. 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).

25 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

5 evaluó 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 se comparó 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.

15 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.

20 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

30 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.

40 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

45 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.

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.

55 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).

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.

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
-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

Descripción del Modelo	ABC aparente	ABC corregido
-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%), IL17A + 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).

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”.

Modelo	Precisión (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor Predictivo Positivo (%)	Valor Predictivo Negativo (%)
IL1alpha + tabaco	93.197	94.521	91.892	92.105	94.521
	91.826	92.996	90.819	90.935	93.125
IL1beta + tabaco	93.878	93.151	94.595	94.521	93.421
	93.273	92.641	93.910	93.893	92.921
IL17A + tabaco	89.116	89.041	89.189	89.041	89.333
	88.006	88.250	87.825	87.733	88.556
IL1alpha + IFNgamma + tabaco	95.238	93.151	97.297	97.183	93.590
	93.673	91.604	95.758	95.658	92.177
IL1alpha + IL2 + tabaco	93.878	98.630	89.189	90.000	98.529
	92.085	96.923	87.462	88.249	96.906
IL1alpha + IL3 + tabaco	93.878	87.671	100.000	100.000	89.157
	92.107	86.006	98.257	98.276	87.518

Modelo	Precisión (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor Predictivo Positivo (%)	Valor Predictivo Negativo (%)
IL1alpha + IL4 + tabaco	93.878	93.151	94.595	94.521	93.421
	92.237	91.633	92.93	92.851	92.000
IL1alpha + IL5 + tabaco	93.878	95.890	91.892	92.208	95.833
	92.173	94.198	90.295	90.539	94.244
IL1alpha + IL10 + tabaco	92.517	93.151	91.892	92.000	93.243
	90.820	91.192	90.564	90.630	91.444
IL1alpha + IL12p70 + tabaco	94.558	94.521	94.595	94.595	94.667
	92.978	92.929	93.128	93.143	93.081
IL1alpha + IL13 + tabaco	94.558	89.041	100.000	100.000	90.244
	93.272	88.029	98.540	98.502	89.247
IL1beta + IFNgamma + tabaco	94.558	95.890	93.243	93.421	95.890
	93.776	95.070	92.55	92.702	95.105
IL1beta + IL2 + tabaco	95.238	97.260	93.243	93.506	97.222
	93.922	95.884	92.039	92.332	95.882
IL1beta + IL3 + tabaco	93.878	93.151	94.595	94.521	93.421
	92.856	91.992	93.741	93.666	92.276
IL1beta + IL4 + tabaco	94.558	95.890	93.243	93.421	95.890
	93.544	94.494	92.640	92.801	94.587
IL1beta + IL5 + tabaco	94.558	94.521	94.595	94.595	94.595
	93.328	93.203	93.498	93.485	93.361
IL1beta + IL10 + tabaco	94.558	94.521	94.595	94.595	94.667
	93.563	93.375	93.778	93.755	93.571
IL1beta + IL12p70 + tabaco	95.238	97.260	93.243	93.506	97.222
	94.308	96.203	92.458	92.778	96.162
IL1beta + IL13 + tabaco	94.558	95.890	93.243	93.421	95.890
	93.378	94.44	92.427	92.491	94.528
IL17A + IFNgamma + tabaco	92.517	90.411	94.595	94.366	91.026
	91.11	89.053	93.217	92.997	89.720
IL17A + IL2 + tabaco	91.837	86.301	97.297	97.015	87.952
	90.066	84.995	95.193	94.966	86.635
IL17A + IL3 + tabaco	93.878	90.411	97.297	97.101	91.139
	92.309	89.367	95.308	95.175	90.049
IL17A + IL4 + tabaco	91.837	89.041	94.595	94.286	89.873
	90.459	87.850	93.079	92.745	88.826
IL17A + IL5 + tabaco	89.796	84.932	94.595	94.030	86.585
	87.691	83.097	92.374	91.765	84.850
IL17A + IL10 + tabaco	91.156	87.671	94.595	94.203	88.750
	89.044	85.418	92.795	92.244	86.658
IL17A + IL12p70 + tabaco	93.878	90.411	97.297	97.101	91.139
	92.151	88.803	95.557	95.389	89.570
IL17A + IL13 + tabaco	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
IL1alpha + tabaco	0	1
	-0.0248	0.9396

Modelo	Intercepto	Pendiente
IL1beta + tabaco	0 -0.0012	1 0.9598
IL17A + tabaco	0 -0.0004	1 0.9597
IL1alpha + IFNgamma + tabaco	0 -0.0415	1 0.8746
IL1alpha + IL2 + tabaco	0 -0.049	1 0.8906
IL1alpha + IL3 + tabaco	0 -0.0314	1 0.9042
IL1alpha + IL4 + tabaco	0 -0.0366	1 0.9135
IL1alpha + IL5 + tabaco	0 -0.0377	1 0.9148
IL1alpha + IL10 + tabaco	0 -0.0217	1 0.8486
IL1alpha + IL12p70 + tabaco	0 -0.0134	1 0.8973
IL1alpha + IL13 + tabaco	0 -0.0517	1 0.8878
IL1beta + IFNgamma + tabaco	0 0.0025	1 0.9327
IL1beta + IL2 + tabaco	0 -0.0162	1 0.9253
IL1beta + IL3 + tabaco	0 0.0020	1 0.9303
IL1beta + IL4 + tabaco	0 -0.0126	1 0.9436
IL1beta + IL5 + tabaco	0 -0.0252	1 0.9233
IL1beta + IL10 + tabaco	0 -0.0024	1 0.9120
IL1beta + IL12p70 + tabaco	0 -0.0114	1 0.9180
IL1beta + IL13 + tabaco	0 -0.0018	1 0.9125
IL17A + IFNgamma + tabaco	0 -0.0142	1 0.8849
IL17A + IL2 + tabaco	0 -0.0260	1 0.9153
IL17A + IL3 + tabaco	0 -0.0252	1 0.9322
IL17A + IL4 + tabaco	0 -0.0286	1 0.9275
IL17A + IL5 + tabaco	0 -0.0294	1 0.9233
IL17A + IL10 + tabaco	0 -0.0051	1 0.8945
IL17A + IL12p70 + tabaco	0 -0.0046	1 0.9150
IL17A + IL13 + tabaco	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 implementado por ordenador para diagnosticar periodontitis crónica en un sujeto, que comprende:
- 5 a) Determinar el nivel de expresión de las citoquinas IL1alfa e IFNgamma en una muestra de fluido crevicular gingival;
- b) Determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador en dicho sujeto;
- c) Aplicar el modelo predictivo multivariante:
- 10
$$-71,383 + 4,622 \times \text{IL1alpha} - 1,146 \times \text{IFNgamma} + 2,042 \times \text{tabaco}$$
- d) Obtener un valor de probabilidad asociado al nivel de expresión de las citoquinas que refiere la probabilidad de padecer periodontitis crónica. Cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe una mayor certeza en el diagnóstico de periodontitis crónica. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de padecer o no periodontitis crónica.
- 15
2. Método in vitro según la reivindicación 1 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
3. Método in vitro según la reivindicación 2 en el que dicho nivel de expresión de la citoquina comprende determinar el nivel de la proteína.
4. Método in vitro según las reivindicaciones 2 y 3 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
5. Método in vitro implementado por ordenador para determinar el riesgo de desarrollar en un futuro de periodontitis crónica en un sujeto con salud periodontal que comprende:
- a) Determinar el nivel de expresión de las citoquinas IL1alfa, e IFN gamma, en una muestra de fluido crevicular gingival;
- 30 b) Determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador en dicho sujeto;
- c) Aplicar el modelo predictivo multivariante:
- $$-71,383 + 4,622 \times \text{IL1alpha} - 1,146 \times \text{IFNgamma} + 2,042 \times \text{tabaco}$$
- 35 d) Obtener un valor de probabilidad asociado al nivel de expresión de las citoquinas, que refiere la probabilidad de riesgo de padecer en un futuro periodontitis crónica detectable clínicamente. Cuanto más alto sea el valor de probabilidad, existe un mayor riesgo de padecer una futura periodontitis crónica. El valor 0,5, es indicativo de existir la misma probabilidad de padecer o no periodontitis crónica.
- 40
6. Método in vitro según la reivindicación 5, 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
7. Método in vitro según reivindicación 6 en el que dicho nivel de expresión de la citoquina comprende determinar el nivel de la proteína.
8. Método in vitro según reivindicación 6 y 7 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.
- 50
9. Método in vitro implementado por ordenador para determinar la respuesta a un tratamiento específico de un paciente con periodontitis crónica que comprende:
- a) Determinar el nivel de expresión de las citoquinas IL1alfa, IFN gamma, en una muestra de fluido crevicular gingival del sujeto;
- 55 b) Determinar la condición de fumador, no fumador o exfumador en dicho sujeto;
- c) Aplicar el modelo predictivo multivariante:
- $$-71,383 + 4,622 \times \text{IL1alpha} - 1,146 \times \text{IFNgamma} + 2,042 \times \text{tabaco}$$

- 5 d) Obtener un valor de probabilidad asociado al nivel de expresión de las citoquinas, que refiere la probabilidad de una peor respuesta a un determinado tratamiento clínico de un paciente con periodontitis crónica. 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.
- 10 10. Método in vitro según la reivindicación 9, 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.
- 15 11. Un método in vitro según reivindicación 10 en el que dicho nivel de expresión de la citoquina comprende determinar el nivel de la proteína.
- 20 12. Un método in vitro según reivindicación 10 y 11 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 13. Kit para diagnóstico de la enfermedad, del riesgo de padecer la enfermedad y/o de la efectividad de un tratamiento en periodontitis crónica que comprende:
- a) Dos anticuerpos que se unen específicamente a las citoquinas **IL1alpha** e **IFNgamma**,
 - b) Unas instrucciones,
 - c) Un control positivo,
 - d) Un control negativo.
- 30 14. Kit según la reivindicación 13 que incluye información para el cálculo del diagnóstico de la enfermedad, del riesgo de padecer la enfermedad y/o de la efectividad del tratamiento que se obtiene mediante la aplicación del siguiente modelo predictivo multivariante:
- $$-71,383 + 4,622 \times \text{IL1alpha} - 1,146 \times \text{IFNgamma} + 2,042 \times \text{tabaco}$$
15. Kit según la reivindicación 14 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

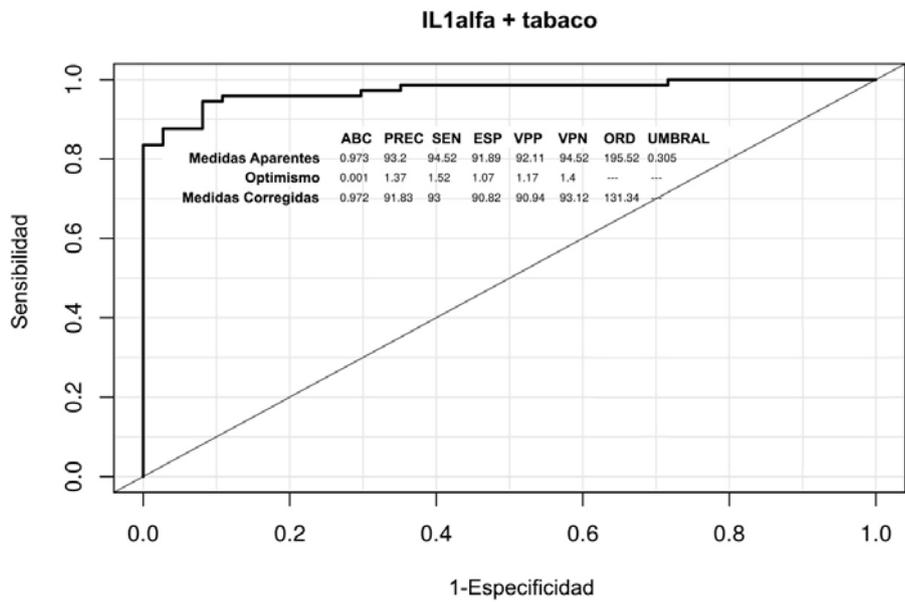
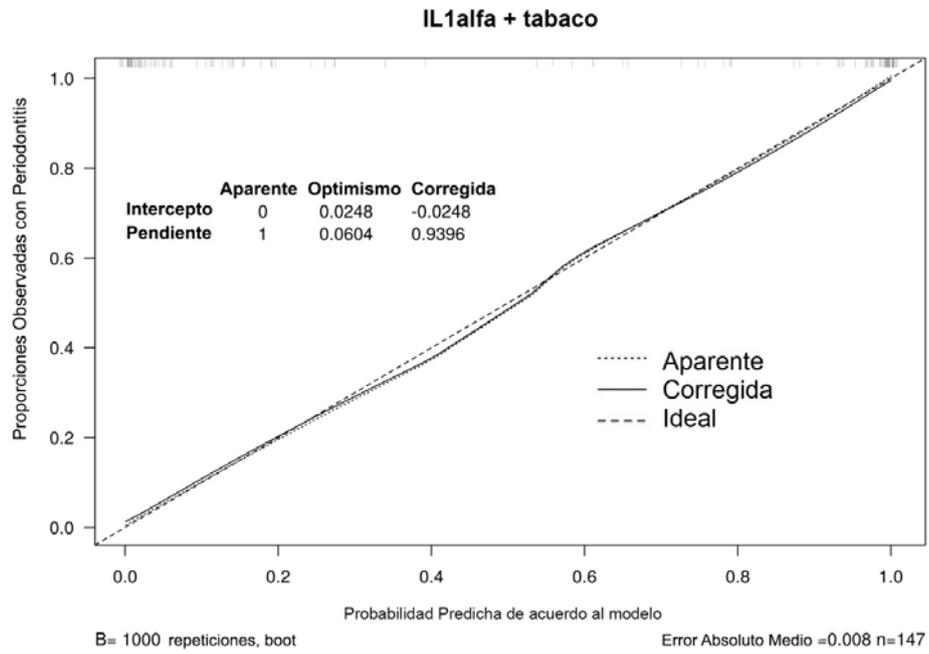


FIG.1