



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA

**CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A DIFERENTES TIPOS
DE MUERTE CELULAR PRESENTES EN EL FLUIDO GINGIVAL
CREVICULAR DURANTE LA PROGRESIÓN DE LA PERIODONTITIS**

Javiera Belén Alcaíno Monsalves

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Fermín González Bergas

TUTOR ASOCIADO

Dr. Alfredo Torres Pérez

Adscrito a Proyecto FIOUCH 17-007

Santiago - Chile

2024



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA

**CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A DIFERENTES TIPOS
DE MUERTE CELULAR PRESENTES EN EL FLUIDO GINGIVAL
CREVICULAR DURANTE LA PROGRESIÓN DE LA PERIODONTITIS**

Javiera Belén Alcaíno Monsalves

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Fermín González Bergas

TUTOR ASOCIADO

Dr. Alfredo Torres Pérez

Adscrito a Proyecto FIOUCH 17-007

Santiago - Chile

2024

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá Eva, guerrera de la vida y ejemplar, por su dedicación, sacrificio y amor, que hicieron posible mis sueños. También a mi hermana Camila por siempre apoyarme e impulsarme. A mis gatos por acompañarme durante la difícil carrera, en mis días y noches de estudio. A mis perros por lograr mantenerme activa. A mi hermana Carla por animarme. A mis compañeros(as) y amigos(as), con los cuales compartimos conocimientos y ánimos. A cada uno de mis profesores(as) de clínica, que me aconsejaron, enseñaron y fomentaron mis ganas de seguir aprendiendo y mejorando.

Por último, agradezco el apoyo de mi profesor guía el Dr. Fermín y mi profesor ayudante Dr. Torres, junto al proyecto FIOUCH 17-007, durante este último proceso para obtener el título de cirujano dentista.

Gracias a todos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Periodontitis.....</i>	1
1.2 <i>Progresión de la periodontitis.....</i>	2
1.3 <i>Importancia del Fluido Gingival Crevicular.....</i>	2
1.4 <i>Respuesta inmune en la enfermedad periodontal</i>	3
1.5 <i>Muerte celular y respuesta inmune</i>	4
1.5.1 <i>Apoptosis.....</i>	5
1.5.2 <i>Necroptosis</i>	6
1.5.3 <i>Netosis</i>	7
1.5.4 <i>Ferroptosis</i>	8
1.5.5 <i>Piroptosis.....</i>	8
1.6 <i>Análisis in silico y bioinformático.....</i>	9
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO.....	13
2.1 <i>Hipótesis.....</i>	13
2.2. <i>Objetivo general</i>	13
2.3 <i>Objetivos específicos</i>	13
3. METODOLOGÍA.....	14
3.1 <i>Diseño del estudio.....</i>	14
3.2 <i>Universo y muestra</i>	14
3.3 <i>Criterios de selección</i>	14
3.4 <i>Análisis in silico y bioinformático.....</i>	14
3.5 <i>Análisis in vitro</i>	16
3.6 <i>Análisis de datos de secuenciación de ARN de células individuales (scRNA-seq).....</i>	18
3.7 <i>Análisis estadístico.....</i>	18
4. RESULTADOS.....	20
4.1 <i>Descripción de los antecedentes recolectados en las bases de datos curadas y del subconjunto de proteínas a analizar.....</i>	20
4.2 <i>Caracterización e Interacción entre proteínas de ferroptosis.....</i>	24

4.2.1 Red de interacción proteína - proteína de ferroptosis.....	30
4.3 Caracterización e Interacción entre proteínas de apoptosis.....	31
4.3.1 Red de interacción proteína-proteína de apoptosis.....	35
4.4 Caracterización e Interacción entre proteínas de piroptosis.....	36
4.4.1 Red de interacción proteína - proteína de piroptosis.....	40
4.5 Caracterización e Interacción entre proteínas de netosis.....	40
4.5.1 Red de interacción proteína - proteína de netosis.....	45
4.6 Caracterización e Interacción entre proteínas de necroptosis.....	46
4.6.1 Red de interacción proteína-proteína de necroptosis.....	51
4.7 Comportamiento de la expresión de proteínas con una diferencia significativa para cada MCR, dentro del proteoma FGC.....	52
4.8 Western blot de proteínas biomarcadoras.....	59
4.9 Secuenciación de ARN unicelular para el análisis de susceptibilidad de células periodontales a las cinco MCR.....	60
5. DISCUSIÓN:	66
6. CONCLUSIONES	77
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
8. ANEXOS Y APÉNDICES	97

RESUMEN

Introducción: La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial asociada a una biopelícula disbiótica y a una disrupción de la respuesta inmunológica, se caracteriza por la destrucción progresiva del aparato de soporte dentario. La muerte celular (MC) puede ser fisiológica o patológica, se distingue al presentar conjuntos de mecanismos destinados a la eliminación selectiva de células, regulando su sobrevivencia, la regeneración de los tejidos y la respuesta inmune del cuerpo. La desregulación de la respuesta inmuno-inflamatoria es el principal impulsor de la progresión de la periodontitis. Es plausible que los eventos moleculares involucrados en la dinámica de progresión y remisión de la periodontitis estén relacionados con diferentes formas de MC. El objetivo de este estudio fue identificar y caracterizar grupo específico de proteínas asociadas a distintos tipos de MC, identificables en el fluido gingival crevicular (FGC) de sacos periodontales durante la progresión clínica de la periodontitis.

Material y métodos: Se combinaron datos proteómicos de muestras de FGC en 23 sacos periodontales en progresión y 25 en no progresión, pertenecientes a hombres entre 35 a 65 años, diagnosticados con periodontitis, junto con el análisis *in silico* y herramientas bioinformáticas para identificar proteínas asociadas con la progresión de la periodontitis y su conexión con MC. Para la confirmación de la progresión, se analizaron los datos con transferencia Western. Para dilucidar la dinámica celular durante la progresión de la periodontitis, se estudiaron conjuntos de datos de secuenciación de ARN de célula individual (scRNA-seq) (GSE164241) de tejido gingival marginal.

Resultados: la minería de datos junto al proteoma del FGC logró identificar proteínas, con diferencia significativa, de MC tipo ferroptosis, apoptosis, piroptosis, netosis y necroptosis. Mediante scRNA-seq se sugiere que las principales células que participan en las MC en tejido gingival son: células epiteliales, fibroblastos y monocitos/macrófagos. Durante la progresión de la periodontitis, se identificó de forma exclusiva la proteína SNCA.

Conclusiones: los resultados muestran un posible vínculo entre proteínas asociadas a procesos de MC, con la dinámica de progresión-remisión de la

periodontitis, lo que pueden orientar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas. Sin embargo, aún requiere más información para estudiar el potencial de estos hallazgos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Periodontitis

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial asociada a una biopelícula disbiótica y que se caracteriza por la destrucción progresiva del aparato de soporte dentario (Papapanou y cols., 2018), es decir del ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar (Slots, 2017). Su etiopatogenia es compleja ya que se conjuga la presencia de un hospedero susceptible, factores locales predisponentes y la disbiosis del biofilm, gatillando una respuesta inmune inflamatoria crónica desregulada (Lamont y Hajishengallis, 2015). No obstante lo anterior, la presencia de factores sistémicos y factores genéticos también tienen un rol en la etiopatogenia de la enfermedad (da Silva y cols., 2017).

Entre las manifestaciones clínicas de la periodontitis se encuentran: aumento de la profundidad al sondaje, pérdida de inserción clínica, inflamación gingival y pérdida de hueso alveolar evaluada radiográficamente, y en casos más severos con la pérdida dentaria (Papapanou y cols., 2018). Cabe mencionar que su prevalencia es alta, siendo la undécima enfermedad más prevalente a nivel mundial, mayor que las enfermedades cardiovasculares (Janakiram y cols., 2020). En Chile, es un problema de salud pública que afecta negativamente la función masticatoria, la estética y la calidad de vida, con una prevalencia del 39% en adultos entre 35 - 44 años y con un 90% entre 65 - 74 años (Gamonal y cols., 2010; Ministerio de Salud, 2017).

A nivel de las características ultraestructurales e histopatológicas en la periodontitis, se encuentra la pérdida de colágeno perivascular durante los primeros días de su desarrollo. Luego existe un denso infiltrado linfocitario y de otras células mononucleares, una alteración patológica de los fibroblastos y la pérdida continua de tejido conectivo. Además, en relación a las bacterias presentes, se puede observar que con el tiempo hay un aumento de la microbiota anaerobia Gram negativo (Botero, 2009). Como resultado de la periodontitis, pueden presentarse diversas consecuencias, entre las cuales se incluyen cambios histopatológicos irreversibles, la formación de sacos periodontales, movilidad dentaria, destrucción

del ligamento periodontal y pérdida del soporte óseo. En última instancia, estas complicaciones pueden culminar en la pérdida de dientes (Trindade y cols., 2014).

1.2 Progresión de la periodontitis

La progresión de la periodontitis se consideró como una tasa de pérdida de inserción clínica lineal, constante y relativamente lenta. Sin embargo, las evidencias han demostrado que existen periodos de actividad/exacerbación poco frecuentes y episódicos, durante los cuales ocurre la pérdida de los tejidos de soporte, y periodos de remisión espontánea (Goodson y cols., 1982; Teles y cols., 2016; Bostanci y cols., 2019). Estos eventos moleculares que desencadenan la progresión y la remisión de la periodontitis aún no están cabalmente comprendidos.

Los métodos de detección de la progresión se han basado en la medición del nivel de inserción clínica de los tejidos periodontales, mediante el uso de sondas periodontales (Harry y cols., 1999). Para el seguimiento y diagnóstico de enfermedades periodontales y periimplantaria, se ha implementado la detección de metaloproteinasas de matriz (MMP) en fluidos orales. Estos estudios llevaron a cabo pruebas clínicas diagnósticas con IFMA (ensayo inmunofluorométrico de resolución temporal) y ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), tiras inmunocromatográficas específicas para MMP-8, similar a pruebas de embarazo marcando positivo o negativo, permitiendo diferenciar sitios sanos de los enfermos. Si bien no es ampliamente utilizado en la práctica clínica, es una herramienta útil y complementaria, tanto para diagnóstico como el monitoreo de la periodontitis y periimplantitis usando el fluido gingival crevicular (FGC) (Sorsa y cols., 2016).

1.3 Importancia del Fluido Gingival Crevicular

El fluido gingival crevicular (FGC) es un trasudado sérico derivado del plexo vascular de los tejidos periodontales, y se forma en el área entre los dientes y la encía (Lamster, 1997). Está constituido por moléculas derivadas del suero, células hospederas del periodonto, leucocitos y productos bacterianos provenientes de la placa subgingival. En condiciones inflamatorias, se convierte en un exudado inflamatorio que contiene componentes derivados de los procesos de destrucción local de los tejidos de soporte periodontal, entre ellos productos de la degradación

del tejido conjuntivo o epitelial del huésped, placa microbiana subgingival, proteínas extracelulares, mediadores y células inflamatorias del huésped (Barros, 2016). Por lo tanto, ofrece un gran potencial como una fuente de factores que pueden asociarse con la actividad osteoclástica y el estado de salud o enfermedad de los tejidos periodontales. La medición y análisis de las proteínas presentes en el FGC ha contribuido a comprender la patogenia y la progresión de la enfermedad periodontal (Huynh y cols., 2015).

La recolección del FGC se realiza mediante diferentes métodos, tales como: tiras de papel, tubos capilares, lavado gingival y conos de papel. En la última década, se ha favorecido el uso de tiras de papel debido a la fácil inserción en la hendidura gingival hasta 1 mm de profundidad sin sangrado de los sacos periodontales (Khurshid y cols., 2016; Santhosh y cols., 2023; Cebesoy y cols., 2024).

Una forma de comparar tanto los periodos de actividad como de inactividad de la periodontitis, es analizando los componentes del FGC, como las proteínas, ya que es una importante fuente de estudio del comportamiento metabólico y de los procesos biológicos de los tejidos periodontales, cada proteína presente, desempeña un papel funcional específico (Khurshid y cols., 2016).

1.4 Respuesta inmune en la enfermedad periodontal

Al suprimir las medidas de higiene oral, se observa rápidamente una inflamación inicial que desaparece al restablecer la higiene y eliminar la placa bacteriana acumulada. En la fase inicial de la lesión periodontal, ocurren cambios vasculares y una respuesta inmune innata dominada por polimorfonucleares neutrófilos (PMN). Estudios recientes han mostrado que, además de los PMN, otros tipos de células inmunitarias como los monocitos CD14+, CD16+ y las células T CD8+ también juegan un papel importante en esta fase inicial, contribuyendo al incremento de la inflamación (Chen y cols., 2024). A medida que la inflamación progresa hacia una lesión establecida, que inicialmente se presenta como gingivitis, una inflamación leve del periodonto, la respuesta inmunitaria adaptativa dominada por linfocitos T CD4+ del perfil Th1, produce citoquinas como IFN γ e IL-2, que activan macrófagos y neutrófilos, además de estimular la producción de anticuerpos IgG. Este balance

inmunológico previene la progresión de la enfermedad, sin embargo, si se rompe este equilibrio y la acumulación bacteriana aumenta, la lesión puede evolucionar hacia un estado más avanzado. Esta progresión se caracteriza por un cambio hacia una microbiota más patogénica y una respuesta inflamatoria sostenida. En la fase avanzada, caracterizada por la formación de bolsas periodontales y pérdida ósea, predominan las células plasmáticas y un incremento en los fenotipos de células B de memoria, que se asocian con una mayor destrucción del tejido periodontal. En este proceso se observan linfocitos T CD4+ del perfil Th2 que producen IL-4, IL-5, IL-9 que activan células B, promoviendo un ambiente inmunosupresor con mayor producción de IgG4 e IgE (Botero, 2009; Maniyammai y cols., 2021; Chen y cols., 2024).

1.5 Muerte celular y respuesta inmune

La relación inmunológica de la periodontitis con la muerte celular permite comprender e integrar los mecanismos de defensa y modulación de la inflamación en enfermedades crónicas como la periodontitis.

La muerte celular es un proceso biológico básico, que implica la “degeneración irreversible de funciones celulares vitales (especialmente la producción de ATP y preservación de la homeostasis redox), que culmina en la pérdida de la integridad celular (permeabilidad permanente de la membrana plasmática o fragmentación celular)” (Galluzzi y cols., 2018). Se caracteriza por presentar un conjunto de mecanismos codificados genéticamente para la eliminación selectiva de células sobrantes, irreversiblemente dañadas y/o potencialmente dañinas, es decir, regula la sobrevivencia de las células, la regeneración de los tejidos y la respuesta inmune del cuerpo. Esta respuesta inmune se activa ante patrones moleculares asociados a daño (DAMP), es decir, los componentes liberados por células en proceso de muerte celular, las cuales son: proteínas intracelulares, ácidos nucleicos, componentes de la matriz extracelular, lípidos oxidados, etc. (Aristizábal y cols., 2013). Los DAMP son reconocidos por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en células inmunitarias, como los receptores para productos finales de glicación avanzada (RAGE) y los receptores tipo Toll (TLR) (Jounai y cols., 2013).

Existen dos subcategorías principales, la muerte celular accidental (MCA) que es un tipo muerte celular instantánea e incontrolable, desencadenada por la exposición a agresiones físicas, químicas o mecánicas extremas. Por otro lado, la muerte celular regulada (MCR), modulada por transducción de señales, por lo que puede ser afectada por intervenciones farmacológicas o genéticas. Dentro de los tipos de muerte celular regulada, se encuentra la apoptosis, muerte celular programada más estudiada subdividida en dos mecanismos, necroptosis, netosis, ferroptosis, piroptosis, etcétera (Galluzzi y cols., 2018).

1.5.1 Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte fisiológica que permite mantener la homeostasia en el organismo, ya que opera como una respuesta adaptativa ante el estrés, dicho de otro modo, ante perturbaciones del ambiente tanto intracelular como extracelular. Una vez finalizada la apoptosis, las células son fagocitadas por células fagocíticas como los macrófagos. Existen dos formas de apoptosis, la intrínseca y la extrínseca (Green y cols., 2016; Galluzzi y cols., 2018).

La apoptosis intrínseca es desencadenada por gran variedad de perturbaciones microambientales como: daño en el ADN, estrés del retículo endoplasmático, sobrecarga de especies reactivas de oxígeno (ROS), abstinencia del factor del crecimiento, alteraciones microtubulares o mitóticas. Presenta un evento clave en el que se produce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (PMEM) de forma irreversible, el cual está reguladas por proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas de la familia BCL2, las que comparten uno a cuatro dominios de homología (BH) es decir, las proteínas BH1, BH2, BH3 y BH4 (Galluzzi y cols., 2018).

Los estímulos proapoptóticos están regulados por BCL2 asociado a X, es decir, proteínas que contienen cuatro de los dominios BH y un dominio transmembrana conservado, los cuales son el regulador de la apoptosis (BAX) y/o antagonista/asesino 1(BAK). Ambos se han descrito en la literatura con la capacidad de formar poros a través de la membrana mitocondrial externa y posiblemente en otras membranas intracelulares. PMEM es antagonizada por proteínas

antiapoptóticas de la familia BCL2, como BCL2, BCL2L1, regulador de la apoptosis (MCL1), BCL2L2 y BCL2A1, y por ende las proteínas de BCL2 antiapoptóticas inhiben a BAX y BAK al prevenir su oligomerización y activación en la formación de poros, tanto de forma directa (secuestro directo de la membrana mitocondrial externa), como indirectamente (secuestro de activadores de BH3) (Galluzzi y cols., 2018; Singh y cols., 2019; Carranza y cols., 2020).

En cuanto a la apoptosis extrínseca, ésta se inicia ante perturbaciones del microambiente extracelular, por lo que es impulsada ante la unión de ligandos afines al receptor de muerte celular o al receptor de dependencia. Los receptores de muerte celular de superficie celular FAS (o también conocidos como APO-1), y proteínas de la familia de receptores de TNF 1A (TNFR1), 10a (DR4) y 10b (DR5). Los ligandos para receptores de muerte celular permiten el ensamblaje del complejo multiproteico dinámico en la cola intracelular del receptor denominado “complejo de señalización inductor de muerte”, esta unión tiene la posibilidad de inducir la apoptosis a través de dos vías diferentes: una es por células de tipo I, es decir, por linfocitos, timocitos, etc.; o por células de tipo II, como hepatocitos, células cancerosas, células beta pancreáticas. En la vía dada por las células tipo I, la maduración proteolítica depende de CASP8, el cual es ejecutado por CASP3 y CASP7, siendo suficiente para impulsar la MCR. Por otro lado, la vía dada por las células de tipo II, la activación de CASP3 y CASP7 está limitada por XIAP (inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X) (Galluzzi y cols., 2018; D'Arcy, 2019).

1.5.2 Necroptosis

La necroptosis, es iniciada por perturbaciones del microambiente tanto extracelular como intracelular, que son reconocidas por los receptores específicos de muerte celular FAS y TNFR1, o por receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) como TLR3, TLR4 y el de unión a proteínas Z-DNA 1 (ZBP1). Participa en las funciones adaptativas que generan respuestas fallidas al estrés, en programas de garantía del desarrollo para asegurar la eliminación de organismos potencialmente defectuosos antes del nacimiento, y en conservar la homeostasis de las células T adultas (Galluzzi y cols., 2018).

Este tipo de muerte celular regulada depende de la activación secuencial de RIPK3 y de los distintos dominios de las quinasas de linaje mixto (MLKL). Luego de iniciada la necroptosis por el reconocimiento de TNFR1, RIPK3 es activado por RIPK1, seguidamente RIPK3 activa la fosforilación de MLKL, resultado en la formación de oligómeros de MLKL, que se transportan hacia la membrana plasmática donde se unen con especies específicas de fosfatidil inositol fosfato, desencadenando la permeabilización de la membrana plasmática (Galluzzi y cols., 2018; Carranza y cols., 2020).

1.5.3 Netosis

Durante la respuesta del hospedero ante una infección bacteriana y fúngica, participan los neutrófilos que son leucocitos polimorfonucleares (PMN), que constituye la primera línea de defensa inespecífica (Barbieri y cols., 2005). Su acción microbicida consta de la fagocitosis y liberación de enzimas y productos proteolíticos al medio extracelular, pero además existe otra acción, la muerte celular denominada Netosis (Pérez y cols., 2020).

La netosis es un proceso de muerte celular producida por neutrófilos, que consiste en liberar al espacio extracelular redes de ADN que contiene histonas y proteínas granulares, denominado “Trampas Extracelular de Neutrófilos” (NET). Esta malla atrapa microorganismos, produciendo la destrucción o inhibición de su crecimiento. Las NET son formadas por PMN activados, estos se activan a través de los receptores para quimioquinas, citoquinas, complejos inmunes, PAMP, DAMP, C3a o 5a, y complemento C3 y C4 y sus derivados. Dependiendo del estímulo puede ejercer efectos proinflamatorios y antiinflamatorios (Vitkov y cols., 2020).

La periodontitis de inicio temprano se relaciona con defectos genéticos y en el caso de los PMN, genera el deterioro de los NET por mutaciones en sus receptores. La periodontitis de aparición tardía se vincula con una hiperreactividad de los PMN (Vitkov y cols., 2020).

1.5.4 Ferroptosis

La ferroptosis es un tipo de MCR no apoptótica, gatillada por perturbaciones del microambiente celular específicas, dado por procesos de peroxidación lipídica grave. Este tipo de muerte es dependiente de hierro y de generación de ROS (Galluzzi y cols., 2018). Se puede observar un aumento de este proceso, luego de sufrir estrés ambiental en modelos experimentales.

Las células que sufren de ferroptosis no presentan las características morfológicas de la apoptosis, al contrario en estudios *in vitro* han observado un aumento del volumen celular, forma redondeada, y ruptura de la membrana plasmática, además el núcleo conserva su integridad y carece de concentración de cromatina —propio de la células que experimentan apoptosis—, a pesar de que este tipo de muerte celular es activado por componentes que generan daño oxidativo en el ADN, y también han distinguido la ultraestructura mitocondrial alterada, como su aumento de volumen (Chen y cols.,2021).

En la homeostasis de hierro, participan proteínas en la captación de hierro, como transferrina, lactoferrina y el receptor de transferrina (TFRC), así como el coactivador del receptor nuclear 4 (NCOA4) que se encarga de la degradación de ferritina. Las proteínas que contribuyen con la disminución de la ferroptosis al prevenir la captación de hierro mediada por citoesqueleto o por impulsar la exportación de ferritina al espacio extracelular, y también por la participación de chaperonas de hierro como la proteína de unión a poli PCBP1 disminuyen la sensibilidad a la ferroptosis en los hepatocitos. Las enzimas claves que causan la ferroptosis, y que participan la peroxidación lipídica, son las isoformas de araquidonato lipoxigenasa (ALOX), abarcando ALOX5, ALOX12, ALOX15, ALOX15B y ALOXE3 (Chen y cols.,2021)

1.5.5 Piroptosis

La piroptosis es una forma de MCR que es generada a través del sistema inmunológico innato al reconocer PAMP y DAMP que desencadena el ensamblaje de complejos de señalización supramolecular denominado inflamomas, que rápidamente activa a las caspasas inflamatorias, integradas por caspasa-1,

caspasa-11 murino o sus homólogos humanos caspasa -4 y -5 y estas procesan procitoquinas y gasdermina. La gasdermina (GSDM) pertenece a la familia de proteínas formadoras de poros de membrana plasmática GSDMA, GSDMB, GSDMC, GSDMD, GSDME y DFN59, siendo GSDMD la proteína ejecutora de la piroptosis.

La señalización canónica del inflamasoma es impulsada por caspasa-1 (CASP-1) al unirse con la proteína adaptadora ASC con los receptores NLRP3 o AIM2. La CASP-1 activada se adhiere a las procitoquinas pro-IL-1 β y pro-IL-18, y las corta en su forma activa IL-1 β y IL-18, respectivamente, generando la lisis de la célula. En cambio, la señal no canónica del inflamasoma es promovida por caspasas -4 y -5 (CASP-4 y CASP-5) cuando se unen directamente con LPS y fosfolípidos oxidados autocodificados (Xia, S., y cols., 2020).

1.6 Análisis *in silico* y bioinformático

Una gran cantidad de información derivada de los fluidos biológicos orales, incluido el FGC y la saliva, se completan y clasifican progresivamente a medida que avanzan las tecnologías analíticas y las herramientas bioinformáticas. Las ciencias “ómicas” contemporáneas, como la proteómica y la transcriptómica, ayudan a integrar y comprender gran conjunto de datos, desde cómo las moléculas implicadas en el funcionamiento de un organismo causan ciertas enfermedades (Vela, 2017), hasta cómo tecnologías proteómicas, han logrado descifrar el estado molecular del huésped en la enfermedad, así como las interacciones del huésped con el microbioma (Bostanci y cols., 2019). Recientemente, se ha identificado un repertorio de proteínas del FGC tanto en salud como en enfermedad periodontal, definiendo un proteoma específico para la progresión y no progresión de la periodontitis (Torres y cols., 2023). Además, se ha recopilado células humanas de tejidos de la mucosa oral en salud y en enfermedad periodontal, creando un atlas de la mucosa oral que incluye firmas transcripcionales que permiten evaluar la expresión celular de genes relacionados con la susceptibilidad a la enfermedad periodontal (Williams y cols., 2021). En estudios que integran las tecnologías transcriptómicas y proteómicas, han logrado revelar interacciones altamente dinámicas y diferenciales entre el ARN y la

cinética de las proteínas durante el desarrollo de los neutrófilos humanos (Hoogendijk y cols., 2019).

El análisis *in silico* complementa las ciencias “ómicas” al realizar simulaciones y predicciones a través de computadoras, integrando múltiples metodologías informáticas para procesar y transmitir información mediante modelos predictivos, sistemas de detección, bases de datos y simulaciones. Este enfoque ha impactado significativamente en diversas disciplinas como la toxicología genética y la cardiotoxicidad, permitiendo la exploración de mecanismos moleculares complejos en un entorno computacional (Velázquez y Garibay, 2017; Valerio, 2014).

Por ende, la bioinformática o biología *in silico*, es un instrumento rico en información que permite la comprensión a nivel molecular, y que favorece el estudio de una gran cantidad de secuencias, expresión y estructuras a través de bases datos públicas y privadas (Fielden y cols., 2002).

Existen diversas bases de datos, entre aquellas que son de libre acceso y que permiten el análisis de proteínas o genes codificantes de proteínas, se pueden nombrar:

1. STRING es una plataforma web que permite obtener información de los interactomas o de la interacción proteína-proteína conocidas y predichas, ya sea de forma física o funcional, permitiendo relacionar las diversas proteínas mediante redes (Szkarczyk y cols., 2017) (Anexo 1).

2. ShinyGO 0.80 es una herramienta computacional basada en bases de datos Ensembl y STRING-db. Contribuye en el procesamiento de conjunto de genes, entregando visualmente la información a través de gráficos de resultados de enriquecimiento de los términos de ontología genética (GO), acceso a las vías Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) y redes de interacción proteína – proteína a través del vínculo con la interfaz de STRING (Ge, 2020).

3. El Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) presenta una base de datos de genes que integra información de múltiples fuentes y amplia gama de especies. La indagación de un registro genético puede incluir la nomenclatura,

secuencias de referencia (RefSeqs), mapas, vías, variaciones, fenotipos y enlaces a recursos específicos del genoma y locus en todo el mundo. Por ende, su contenido representa la integración de la curación y el procesamiento automatizado de RefSeq, base de datos de organismos colaboradores, consorcios como Gene Ontology y otras bases de datos dentro del NCBI. A los genes se les asigna una GeneID para poder identificarlos ya sea de secuencia genómica conocida o no. Su frecuencia de actualización, de la mayoría de los genes, es diaria (Garth y cols., 2015).

4. La base de datos de firmas moleculares (MSigDB) fue diseñada para proporcionar análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA) con el software GSEA. El que contiene colecciones de genes de humanos y ratones. Comprende información que cubre una gama más diversa y amplia de fuentes y tipos de conjuntos de genes, como derivados de recursos especializados como GO, KEGG, TRANSFAC y L2L. Estos conjuntos se adquieren mediante medios computacionales automáticos como curación manual, por lo que afirma contener una mayor cantidad de conjunto de genes (Arthur y cols., 2011).

6. La base de datos FerrDb V2 es una plataforma que permite a través de la curación manual e integración de recursos genéticos externos, es decir, de otras bases de datos, adquirir conocimientos más profundos exclusivos de la ferroptosis. Esto es producto del creciente aumento de investigaciones y con el objetivo de agilizar la obtención de datos de forma oportuna y de alta calidad (Nan Zhou y cols., 2023).

7. Genie data mining tool, es un servidor web, que permite realizar exploración de datos, el cual clasifica con relación a toda la literatura disponible, los genes a investigar y sus ortólogos. Por lo que genera una investigación más expedita, ya que presenta cientos de especies, millones de genes, y ofrece funcionalidades novedosas (Fontaine y cols., 2011).

Considerando que la desregulación de la respuesta inmuno-inflamatoria es el principal impulsor de la progresión de la periodontitis, es plausible que los eventos moleculares involucrados en la dinámica de progresión y remisión de la periodontitis estén relacionados con diferentes formas de MC. Este trabajo se propone

comprender los eventos moleculares que desencadenan la progresión de la periodontitis, considerando los tipos de muerte celular más estudiados.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO

2.1 Hipótesis

Existe un grupo específico de proteínas asociadas a distintos tipos de muerte celular, identificables en el Fluido Gingival Crevicular de sacos periodontales durante la progresión clínica de la periodontitis.

2.2. Objetivo general

Caracterizar las proteínas asociadas a muerte celular presentes en el FGC durante la progresión clínica de la periodontitis.

2.3 Objetivos específicos

1. Identificar, mediante minería de datos, proteínas relacionadas con tipos específicos de muerte celular asociadas a la progresión clínica de periodontitis.
2. Caracterizar las proteínas identificadas según sus interactomas y clasificación funcional.
3. Evaluar la presencia de las proteínas de interés seleccionadas como biomarcadores de muerte celular regulada, en el FGC de pacientes en progresión clínica de periodontitis.

3. METODOLOGÍA.

3.1 Diseño del estudio

El estudio se planificó en dos etapas:

- Primera etapa: Estudio *in silico*, analítico y comparativo.
- Segunda etapa: Estudio *in vitro*, analítico y comparativo sobre muestras de FGC previamente obtenidas por el proyecto FIOUCH 17-007.

3.2 Universo y muestra

En la etapa del estudio *in vitro*, el universo correspondió a pacientes adultos atendidos en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y la muestra son los pacientes seleccionados por el proyecto FIOUCH 17-007, a quienes se les tomó muestras de FGC de sitios periodontales en progresión y no progresión de la pérdida de inserción.

La unidad de análisis fue el saco periodontal: 23 sacos periodontales en progresión y 25 en no progresión. El muestreo fue intencionado por conveniencia.

3.3 Criterios de selección

En la etapa *in vitro*, la unidad de muestreo corresponde a pacientes adultos de entre 35 a 65 años, hombres, sanos sistémicamente, con periodontitis.

3.4 Análisis *in silico* y bioinformático

Para el análisis *in silico* y bioinformático, se consideraron todas las proteínas identificadas asociadas a distintos tipos de muerte celular y periodontitis. Primero se inició la recolección de datos de genes humanos en la base de datos curados de "Genie data mining tool", se usó el término de búsqueda "*periodontitis progression AND regulated cell death*", con el fin de obtener los genes relacionados con la progresión de la enfermedad de la periodontitis y los procesos de muerte celular regulada.

Luego, en la base de datos curados "FerrDb", que es específica de la muerte celular tipo ferroptosis, se recolectó los genes que se describen como supresores,

desclasificados, conductores y marcadores. Se indagó con el término de búsqueda “apoptosis” en la base de datos MSigDB. Posteriormente se usó el término “pyroptosis” en las bases de datos MSigDB y NCBI, se eliminaron los genes duplicados. Luego, se investigó el término de búsqueda “neutrophil extracellular trap” en la base de datos NCBI. Por último, se buscó el término “necroptosis” en la base de datos MSigDB y NCBI, se eliminaron los datos duplicados obteniendo los genes de interés. Dichas bases de datos permitieron la obtención de genes codificadores de proteínas asociadas con la periodontitis, la progresión y los procesos biológicos asociados a muerte celular regulada.

A continuación, para obtener los conjuntos de proteínas de interés, dado por cruce de los datos *in silico* con el proteoma del FGC, se realizó una representación gráfica para cada MCR tipo ferroptosis, apoptosis, piroptosis, netosis y necroptosis, mediante diagrama de Venn de tres conjuntos y así se extrajo el conjunto de proteínas que participan tanto en el proteoma del FGC como de cada una de las cinco MCR (Figura 1).

Posteriormente, con los cinco conjuntos de proteínas de interés, se realizó un análisis de enriquecimiento bioinformático de los genes. Se inicio con ShinyGO 0.80 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go>) para el procesamiento de la información y caracterización según sus vías KEGG, procesos biológicos y funciones moleculares, estos ordenados por la cantidad de genes participe en cada función proceso o vía, con un corte de FDR de 0,05. Con el sitio web de STRING (<https://string-db.org/>) se analizó la red de interacción proteína-proteína (IPP) según su relación funcional y físicas de cada subconjunto. Se visualizó los nodos que representa a cada proteína, los bordes que conecta a cada nodo correspondiente a asociación en relación a una función compartida, según la confianza plasmada (alta $\geq 0,7$), se observó de mayor grosor aquellas con mayor solidez de soporte de datos, y se descartó aquellas proteínas sin relación directa con otras.

3.5 Análisis *in vitro*

Se utilizaron las muestras de FGC obtenidas en el proyecto FIOUCH 17-007 de título “Caracterización proteómica de fluido gingival crevicular de sitios con sacos periodontales antes y durante la progresión clínica de la periodontitis”.

Las proteínas candidatas seleccionadas previamente se evaluaron *in vitro*, a partir de muestras biológicas de FGC, mediante técnicas de laboratorio de western blot para detectar e identificar las proteínas asociadas a muerte celular durante la progresión de la periodontitis.

La electrotransferencia mediante el uso de anticuerpos permitió determinar si las muestras de FGC expresan proteínas de muerte celular, posibilitando realizar comparaciones cuantitativas de los niveles de proteínas entre las diferentes muestras. La técnica inmunoblot constó de los siguientes pasos:

1. Preparación de la muestra: la muestra se obtuvo del proyecto FIOUCH 17-007, al cual se encuentra adscrita la presente tesis de investigación.
2. Electroforesis: las muestras de pacientes sanos, en no progresión (NP) y en progresión (PG), fueron descongeladas en hielos y cargadas en pocillos de geles de poliacrilamidas SDS-PAGE al 10%. El volumen de muestra cargada fue de 40 µl. Se utilizó el marcador de peso molecular de las proteínas, “PageRule™ Prestained Proteína Ladder, 10 a 180kDA”. Las proteínas fueron separadas en presencia Buffer Running 1x, los primeros 15 min a 80V y luego a 110V por 1 hora y 30 minutos.
3. Transferencia a membrana: en Trans-Blot®Turbo™ se usó membrana de fluoruro de polivinilideno (PDVF), a la que se aplicó 25A y 25V por 10 minutos. Para la visualización de las proteínas se dejó en agitación por 10 minutos a 30rpm en solución de rojo Ponceau. Luego de corroborar la visualización de las proteínas, se realizó el bloqueo de la membrana en solución de BSA al 5% en TBS y 0,1% Tween (TTBS) en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Inmunotinción: se incubó el anticuerpo primario durante toda la noche, a 4°C en una solución de BSA al 5% (Tabla 1). Luego se recuperó el anticuerpo y se lavó

la membrana 3 veces por 10 minutos, en una solución TBS Tween 0,1%. Se incubó el anticuerpo secundario por 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente se lavó la membrana 3 veces con TTBS por 7 minutos.

5. Detección de bandas: se detectó las bandas por quimioluminiscencia mediante la solución de Clarity Western ECL (BIO-RAD), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Se visualizó la señal con el software de Li-Cor Odyssey Fc (LI-COR Biosciences).

Las imágenes de las membranas fueron exportadas en formato TIFF a 600dpi y la cuantificación y análisis densitométrico se hizo mediante el software ImageJ versión 1.54g, en el que se cuantificó la intensidad relativa de las bandas. El experimento se realizó por tripletes.

Tabla 1. Especificaciones de los anticuerpos primarios. Se especifica su isotipo, concentración de la solución, peso molecular (kDa), especificaciones del clon y el proveedor del anticuerpo.

Anticuerpos Primarios	Especie	Concentración	Catalogo - Empresa	kDa
IL-6	Rabbit	1:1000	Clone D2K2N, Cat #12153; CST.	21-28
CA1	Rabbit	1:1000	Clone JG38-71, Cat #NBP2-76980; Novus.	29
CA2	Rabbit	1:1000	Clone 001, Cat #NBP2-89522; Novus.	29
FTH1	Rabbit	1:1000	Clone D1D4, Cat #4393; CST.	21
MMP-8	Mouse	1:1000	Ab53017; abcam.	53

Cell Signaling Technology (CST). Cat (número de catálogo).

3.6 Análisis de datos de secuenciación de ARN de células individuales (scRNA-seq).

Se analizó el conjunto de datos de secuenciación de ARN de células individuales obtenido de la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) (GSE164241, disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE164241>) de periodontitis crónica humana y tejidos gingivales marginales clínicamente sanos, para proporcionar una evaluación imparcial de células heterogéneas a nivel unicelular dentro del contexto de complejidad molecular de los tejidos periodontales.

El objetivo principal fue la exploración y aproximación del origen de las diferencias proteómicas a nivel celular. Este enfoque empleó el paquete R Seurat v5.0 para el procesamiento integral de datos, que abarca control de calidad, normalización, corrección de lotes, integración, selección de características, escalamiento de datos, reducción lineal mediante PCA (análisis de componente principal), agrupamiento de células, UMAP (proyección y aproximación múltiple uniforme) y reducción de dimensionalidad con anotaciones de agrupamiento.

Durante la fase de control de calidad, se excluyeron las células con menos de 500 genes, más de 5.000 genes o más del 15% de genes mitocondriales. La expresión genética se normalizó y se escaló utilizando el método "LogNormalize". Después de la normalización, se identificaron 2.000 genes altamente variables (HVG) para cada muestra utilizando el método "vst". Para superar el gran ruido técnico en cualquier característica única de los datos de scRNA-seq, se utilizó una clasificación de PC basada en el porcentaje de varianza explicada por cada PC para escalar los datos. La función FindAllClusters clasificó las celdas en 21 grupos diferentes con una resolución de 0,2. Utilizando la función FindAllMarkers con `logfc.threshold = 0,25`, se identificaron genes expresados diferencialmente (DEG) para cada grupo. La identificación del tipo de célula se basó en los DEG en cada grupo y se validó manualmente.

3.7 Análisis estadístico

Las diferencias en la abundancia relativa de proteínas entre los grupos de muestras se evaluaron mediante una prueba t, con corrección de Mann Whitney para

comparaciones de rango no paramétrico. Las intensidades de las bandas en el experimento de western blot se cuantificaron utilizando el software ImageJ, seguido del análisis de datos utilizando ANOVA unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los valores se presentaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. El análisis de datos y los gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 10 (GraphPad Software Inc.).

4. RESULTADOS

4.1 Descripción de los antecedentes recolectados en las bases de datos curadas y del subconjunto de proteínas a analizar.

Como se mencionó anteriormente, se consiguió el primer conjunto de genes relacionados con la progresión de la enfermedad de la periodontitis y los procesos de muerte celular regulada en la base de datos curados de “Genie data mining tool”, donde se obtuvieron 2655 genes codificantes de proteínas. Luego, en la base de datos curados “FerrDb”, se identificaron 563 genes. De apoptosis se obtuvieron 88 genes en la base de datos MSigDB. A continuación, en la misma base de datos MSigDB, se identificaron 57 genes de piroptosis y en la base de datos NCBI 169 genes, se incorporaron ambas listas de genes y se eliminaron los genes duplicados, resultando en 193 genes. Posteriormente, en la base de datos NCBI, se extrajeron 62 genes de netosis. Por último, en la base de datos MSigDB se registraron 159 genes de necroptosis, en la base de datos NCBI se obtuvieron 147 genes, ambos conjuntos de datos menos aquellos duplicados, resultaron en 280 genes.

Luego se realizó una representación gráfica mediante diagrama de Venn de tres conjuntos, primero de “Periodontitis progression AND regulated cell death”, segundo del proteoma del FGC –obtenidas del proyecto FIOUCH 17-007— y tercero de los cinco tipos de MCR, es decir, de ferroptosis (Figura 1A), apoptosis (Figura 1B), piroptosis (Figura 1C), netosis (Figura 1D) y necroptosis (Figura 1E). Posteriormente, se extrajeron los subconjuntos de interés que abarcaban genes codificantes de proteínas para un tipo de muerte celular que se encuentra en el FGC, los cuales se denominaron como “ferroptosis FGC”, “apoptosis FGC”, “piroptosis FGC”, “netosis FGC” y “necroptosis FGC” (Figura 1).

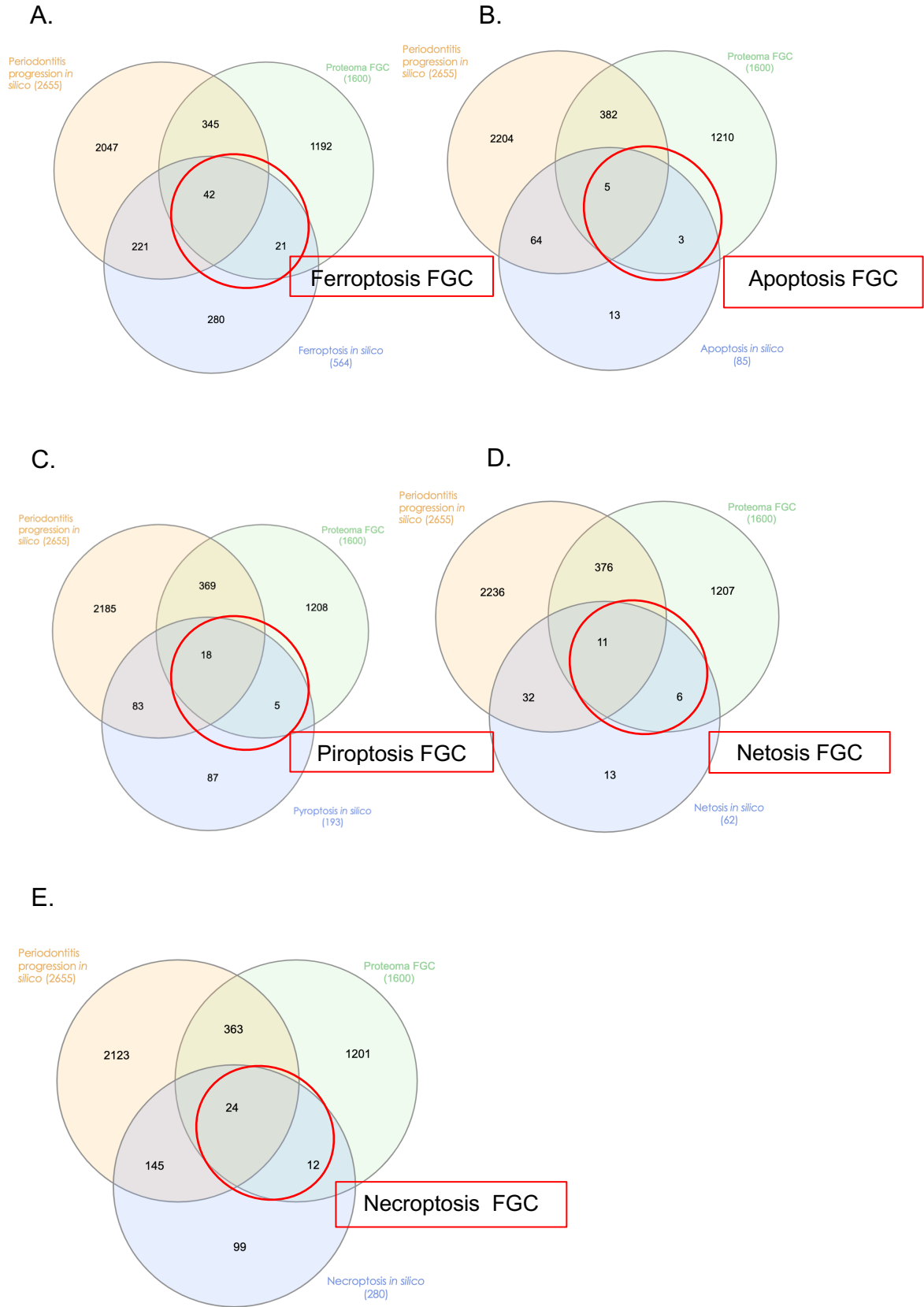


Figura 1. Diagramas de Venn de cada MCR. Representación gráfica de los conjuntos de proteínas de “Periodontitis progression *in silico*”, “Proteoma FGC”, y con las diferentes MCR. A. Ferroptosis y grupo marcado en rojo “ferroptosis FGC”. B. Apoptosis y grupo demarcado en rojo “apoptosis FGC” C. Piroptosis y grupo demarcado en rojo “piroptosis FGC”, D. Netosis y grupo marcado en rojo “netosis FGC”. E. Necroptosis y grupo marcado en rojo “necroptosis FGC”.

Se determinó utilizar el conjunto de proteínas entre la intersección de las proteínas del proteoma FGC con cada una de las MCR (Anexo 1). Se inició la caracterización de este gran grupo de proteínas para comprender en qué procesos y funciones participan las proteínas en un nivel total del FGC.

Según la sobrerrepresentación de la proteína, dada su abundancia relativa dentro del proteoma del FCG, se clasificó su pertenencia al grupo de progresión (PG) y no progresión (NP) de la enfermedad, teniendo un umbral ≥ 2 fold change (Anexo1). También se seleccionó las proteínas que presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) dentro del proteoma (Figura 2). Posteriormente, se realizó la caracterización de las proteínas con diferencia significativa, en cada MCR según la correspondencia al grupo de PG y del grupo NP, por separados, para la obtención de los procesos que están sobrerrepresentados en FGC.

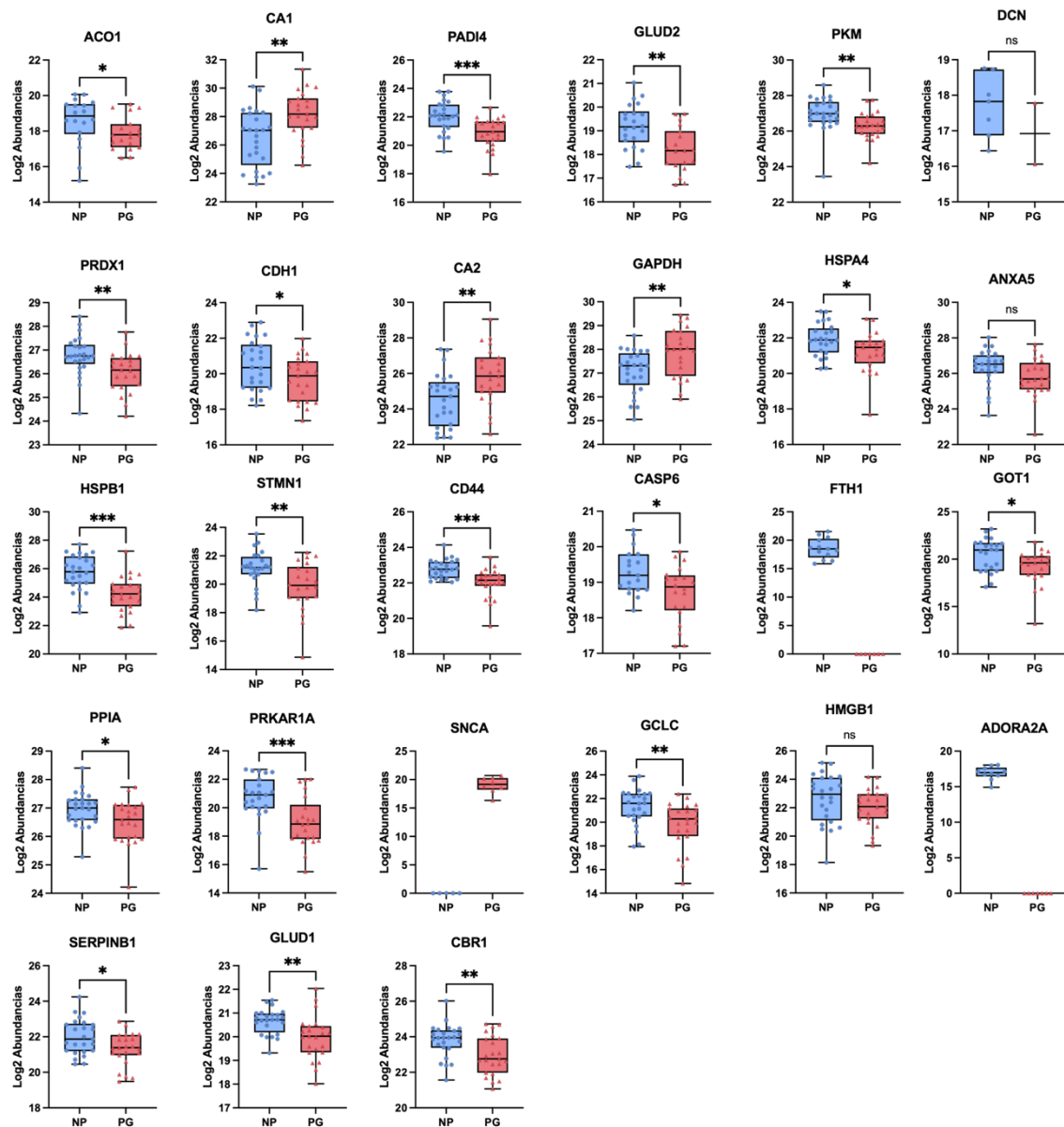


Figura 2. Abundancia relativa de proteínas relevantes, presentes en el FGC, y clasificadas en los diferentes conjuntos de MCR. Ferroptosis; ACO1, CBR1, CD44, CDH1, FTH1, GCLC, GOT1, HMGB1, HSPB1, PRDX1, SNCA, STMN1. Apoptosis; CASP6, PRKAR1A. Piroptosis; ADORA2A, HMGB1, PKM, CASP6. Netosis; HSPB1, HMGB1, PADI4, GAPDH, SERPINB1. Necroptosis; FTH1, HMGB1, HSPA4, PPIA, GLUD1, GLUD2. Las proteínas DCN y ANXA5 se incluyeron por el análisis de scRNA-seq. Las proteínas CA1 y CA2 se incluyeron para el análisis de inmunoblot. *: $p < 0.05$, **: 0.01, ***: 0.001 y ns: no significativo.

4.2 Caracterización e Interacción entre proteínas de ferroptosis.

Dentro del conjunto de proteínas de ferroptosis FGC (Figura 2A), se obtuvo un total de sesenta y tres proteínas de ferroptosis dentro del proteoma del FGC. Del análisis de enriquecimiento, dentro de las vías KEGG se destacan la vía metabólica, metabolismo de carbono, vías de neurodegeneración: múltiples enfermedades y ferroptosis (Figura 3A).

Este conjunto proteico de ferroptosis FGC se dividió en aquellas proteínas que participan en el grupo NP y PG, para un análisis más esclarecedor del rol de las proteínas de ferroptosis durante la progresión de la periodontitis. Resultó en 47 proteínas del grupo NP, y se obtuvo que dentro de las vías KEGG, la vía de ferroptosis presentó menor participación de estos genes codificantes de proteínas, sin embargo, se destacó la vía metabólica, metabolismo de carbono, vías de neurodegeneración; múltiples enfermedades, carcinogénesis química-especies reactivas de oxígeno, entre otras rutas (Figura 3B). En cambio, en las 16 proteínas del grupo PG, destaca nuevamente la vía metabólica, pero le sigue la ruta de ferroptosis, también la de metabolismo de glutatión y vías de neurodegeneración; múltiples enfermedades (Figura 3C).

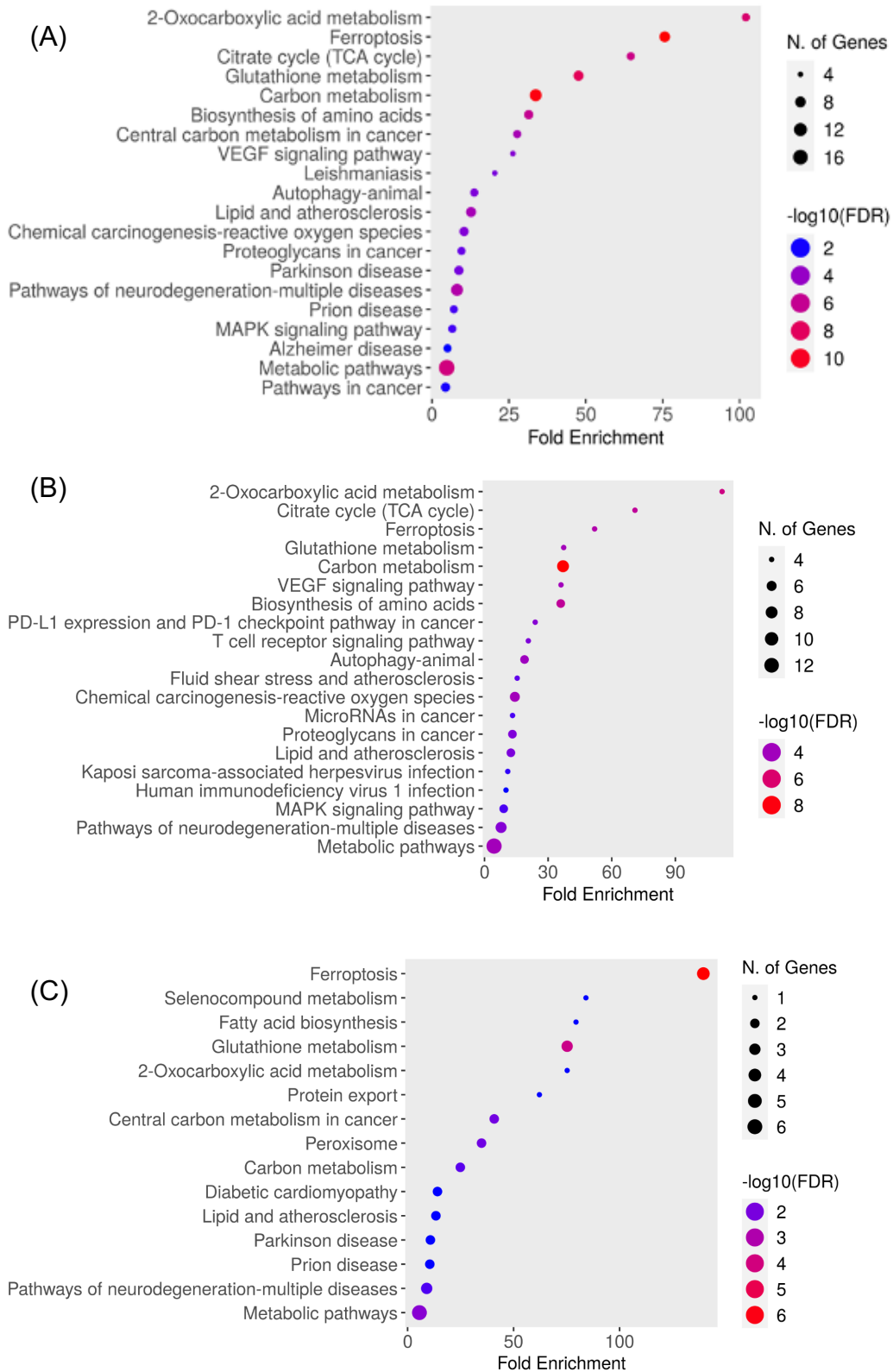


Figura 3. Términos enriquecidos GO de las vías KEGG. Gráficos de puntos generados por ShinyGo 0.80. Se observan los términos GO más enriquecidos para el conjunto proteínas de ferroptosis FGC (A), y de las proteínas del grupo NP (B) y grupo PG (C). El

tamaño del punto representa el número de genes que participan para un término y cuan significativo es el dato de acuerdo a la gradiente de color azul-rojo, donde rojo presenta mayor significancia dado por $-\log_{10}(\text{FDR})$.

En la categoría de procesos biológicos de las proteínas ferroptosis FGC, se distinguen principalmente procesos de respuesta celular al estímulo químico, regulación de la calidad biológica, respuesta al estrés, establecimiento de localización y transporte. También las proteínas participan en procesos homeostático, procesos catabólicos, respuesta a estímulos externos, regulación positiva del proceso metabólico, en procesos metabólicos del fosfato, regulación de la comunicación celular y regulación de la señalización (Figura 4A). Del subconjunto de proteínas que pertenecen al grupo NP, sus principales procesos biológicos son de regulación de calidad biológica, respuesta al estrés, respuesta a sustancias químicas, establecimiento de localización, etcétera (Figura 4B). En cambio, aquellas proteínas que corresponden al grupo PG se destaca la respuesta a sustancias químicas, regulación del metabolismo de las proteínas, respuesta celular al estímulo químico, regulación de la calidad biológica, respuesta al estrés, procesos homeostáticos (Figura 4C).

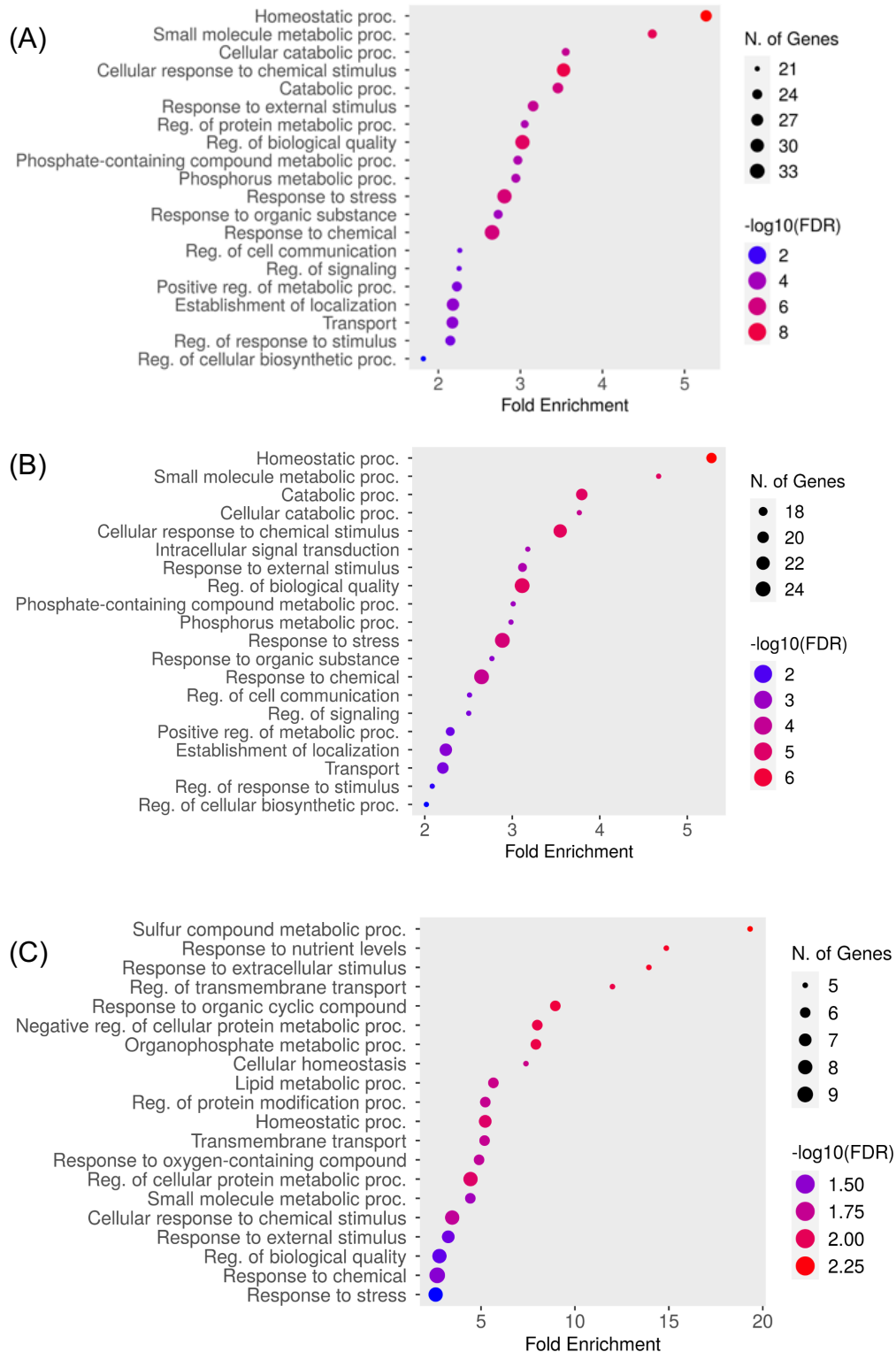
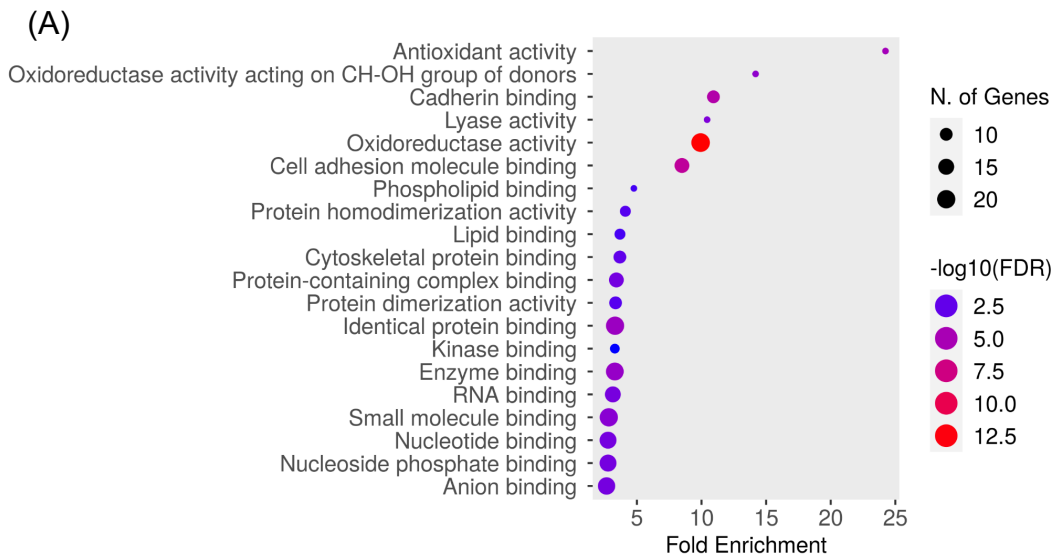


Figura 4. Términos enriquecidos GO de los procesos biológicos. Gráficos de puntos generados por ShinyGo 0.80. Se observan los términos GO más enriquecidos para el conjunto proteínas de ferroptosis FGC (A), y de las proteínas del grupo NP (B) y grupo PG (C). El tamaño del punto representa el número de genes que participan para un término y

cuan significativo es el dato de acuerdo con la gradiente de color azul-rojo, donde rojo presenta mayor significancia dado por $-\log_{10}(\text{FDR})$.

En la categoría de funciones moleculares de las proteínas de ferroptosis FGC, se destacan con mayor significancia y número de genes participantes, la actividad oxidorreductasa. También presentan varias proteínas de unión como a unión a proteína idéntica, unión a moléculas pequeñas, unión a enzimas, unión a anión, unión a nucleótidos, unión a nucleósido fosfato, unión a ARN, unión a complejos nucleicos, unión de cadherina, unión proteínas del citoesqueleto y unión a fosfolípidos (Figura 5A). Del grupo NP se acentúa las funciones de unión a ARN y unión a enzimas, también se destaca la actividad oxidorreductasa (Figura 5B). En el grupo de PG sobresale la actividad oxidorreductasa, también las funciones de unión a nucleótidos, unión a pequeñas moléculas, unión a proteínas idénticas, unión al anión, unión a enzimas, unión al ion calcio, actividad peroxidasa, actividad antioxidante (Figura 5C).



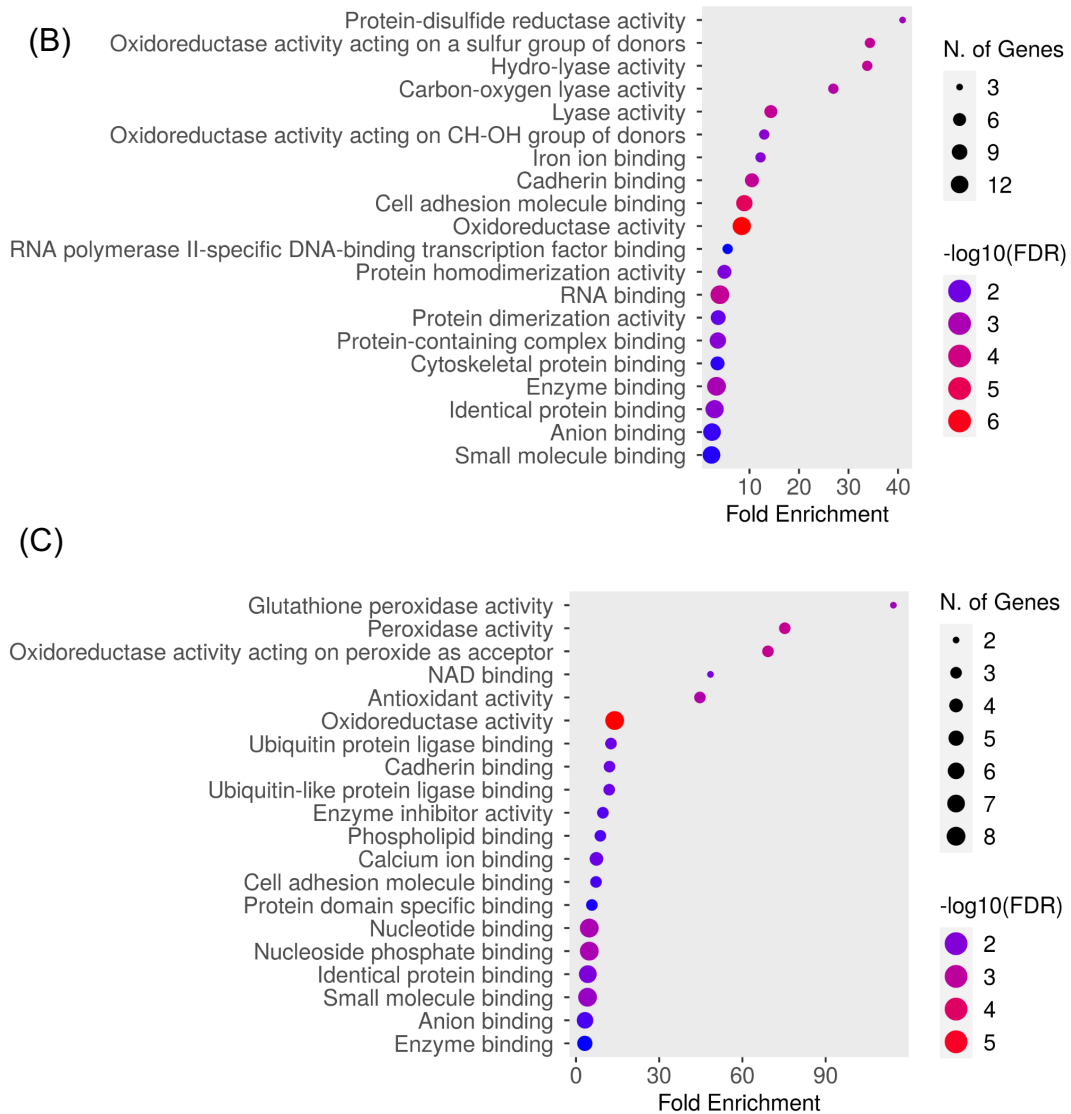


Figura 5. Términos enriquecidos GO de las funciones moleculares. Gráficos de puntos generados por ShinyGo 0.80. Se observan los términos GO más enriquecidos para el conjunto proteínas de ferroptosis FGC (A), y de las proteínas del grupo NP (B) y grupo PG (C). El tamaño del punto representa el número de genes que participan para un término y cuan significativo es el dato de acuerdo con la gradiente de color azul-rojo, donde rojo presenta mayor significancia dado por $-\log_{10}(\text{FDR})$.

Con la base de datos ferrDb V2, exclusiva de MCR tipo apoptosis, se clasificó las proteínas, con diferencia significativa, según categorías como; conductores a SNCA, ACO1 y HMGB1; como marcadores a FTH1 y HSPB1; como supresores CD44, CDH1, GCLC, GOT1, FTH1, HSPB1, y PRDX1. Estas proteínas nombradas, según su relación de abundancia entre PG/NP dentro del FGC presentan mayor

oxidorreductasa (color azul). Se descartaron proteínas sin relación directa con la red, con confianza alta $\geq 0,7$.

4.3 Caracterización e Interacción entre proteínas de apoptosis.

Se encontraron ocho proteínas en el subconjunto apoptosis FGC (Figura 2B). Del análisis de enriquecimiento de datos, dentro de las vías KEGG se destacó primero la ruta de apoptosis, ya que presentó mayor cantidad de genes y mayor significancia con un $-\log_{10}(\text{FDR})$ de 5. Le siguen las rutas de lípidos y aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, vías de neurodegeneración: múltiples enfermedades, apoptosis-múltiples especies (Figura 7A). Estas rutas siguen siendo las principales al analizar las siete proteínas del grupo NP (Figura 7B). La proteína CHP1 presente en mayor abundancia en el grupo PG, no se logró analizar en ShinyGO 0.80 por ser un solo dato.

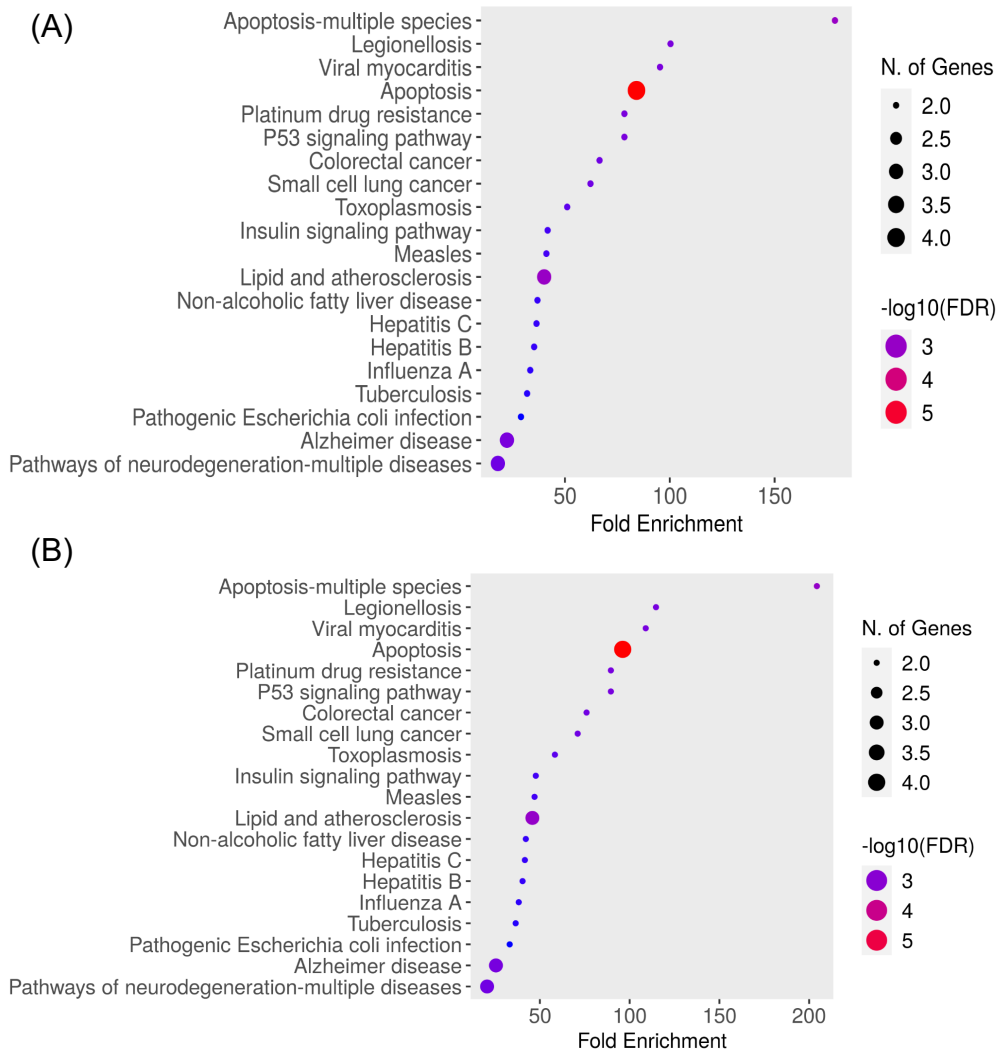
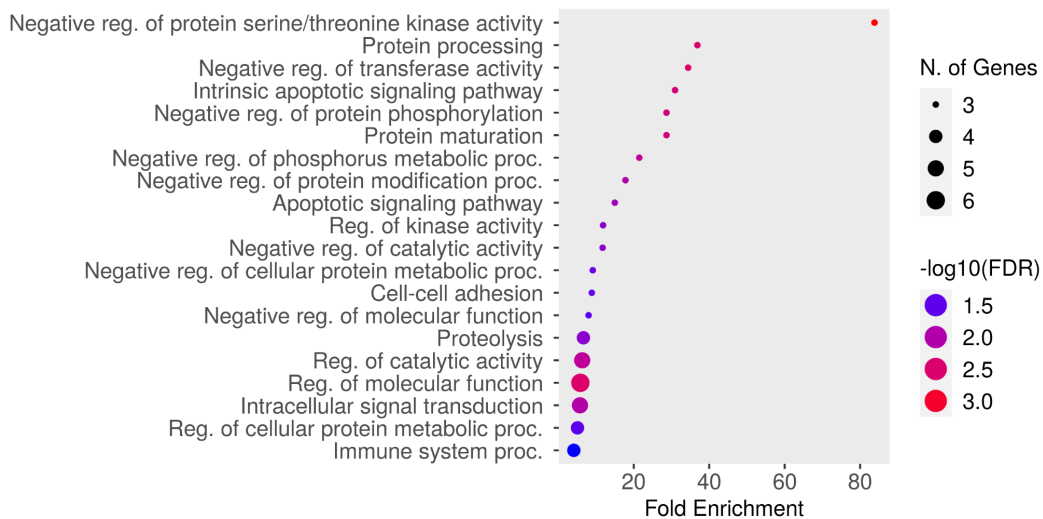


Figura 7. Términos enriquecidos GO de vías KEGG. Gráficos de puntos generados por ShinyGo 0.80. Se observan los términos GO más enriquecidos para el conjunto proteínas de apoptosis FGC (A), y de las proteínas del grupo NP (B). El tamaño del punto representa el número de genes que participan para un término y cuán significativo es el dato de acuerdo con la gradiente de color azul-rojo, donde rojo presenta mayor significancia dado por $-\log_{10}(\text{FDR})$.

Dentro de los procesos biológicos involucrados, se destacan con una mayor participación del número genes los procesos de regulación de la función molecular, regulación de la actividad catalítica, y el de transducción de señal intracelular. También se observan la participación de la regulación negativa de varios procesos como de la actividad de la proteína quinasa, actividad transferasa, de la fosforilación de proteínas, procesos metabólicos del fosforo, del proceso de modificación de

proteínas, de la actividad catalítica y de la función molecular (Figura 8A). De las siete proteínas del grupo NP podemos ver que los procesos de regulación de la función molecular, regulación de la actividad catalítica, transducción de señal intracelular, son nuevamente las de mayor enriquecimiento, dentro de este conjunto de proteínas, y surgen nuevos procesos como proteólisis, regulación del proceso metabólico de las proteínas, procesos del sistema inmunológico (Figura 8B)

(A)



(B)

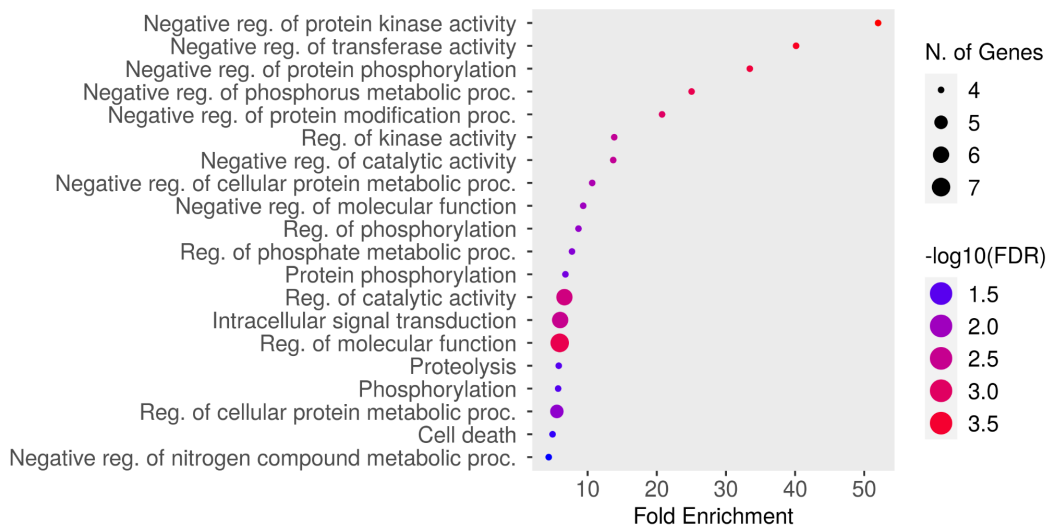
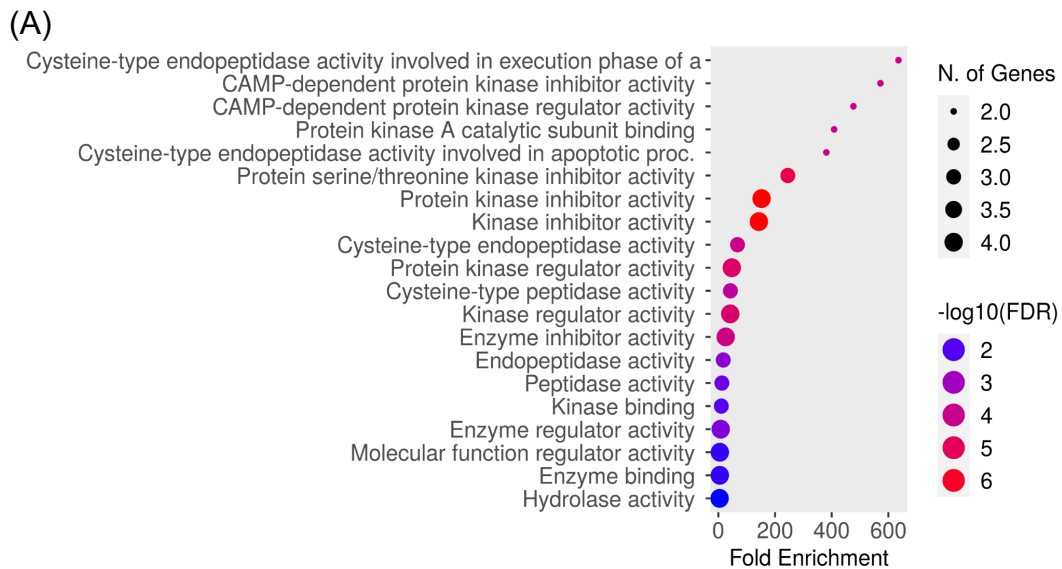


Figura 8. Términos enriquecidos GO de los procesos biológicos. Gráficos de puntos generados por ShinyGo 0.80. Se observan los términos GO más enriquecidos para el

conjunto proteínas de apoptosis FGC (A), y las proteínas del grupo NP (B). El tamaño del punto representa el número de genes que participan para un término y cuán significativo es el dato de acuerdo con la gradiente de color azul-rojo, donde rojo presenta mayor significancia dado por $-\log_{10}(\text{FDR})$.

Las funciones moleculares implicadas en las ocho proteínas, se acentúan la actividad inhibidora de la proteína quinasa y actividad reguladora quinasa. Paralelamente participan en función de unión a enzimas, actividad reguladora de la función molecular y actividad hidrolasa (Figura 9A). De las proteínas de apoptosis FGC que pertenecen al grupo NP se destaca la actividad hidrolasa, actividad inhibidora de la proteína serina/treonina-quinasa, actividad inhibidora de quinasas, actividad endopeptidasa tipo cisteína, actividad peptidasa tipo cisteína, actividad reguladora de quinasas (Figura 9B).



(B)

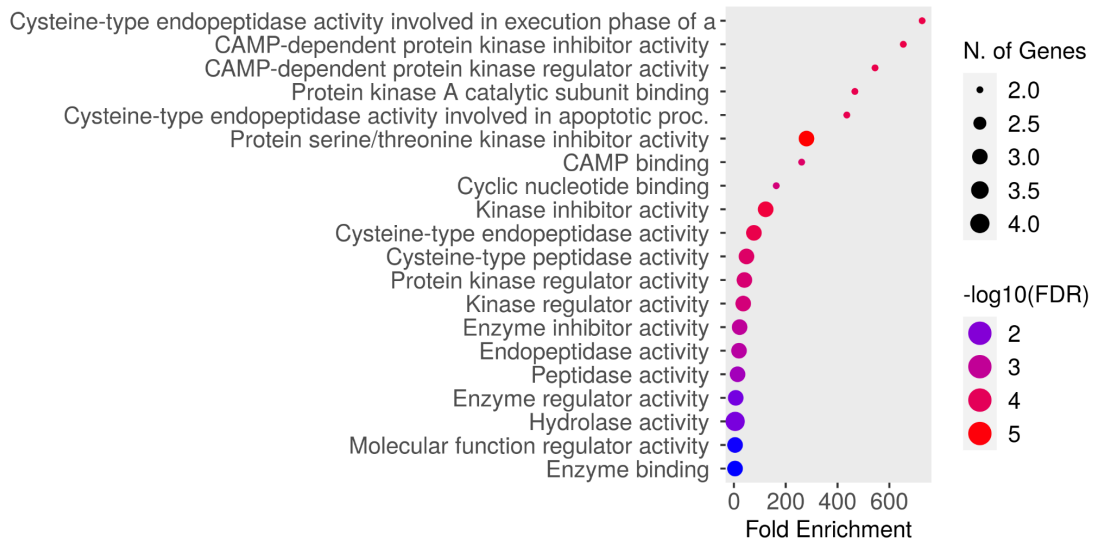


Figura 9. Términos enriquecidos GO de las funciones moleculares. Gráficos de puntos generados por ShinyGo 0.80. Se observan los términos GO más enriquecidos para el conjunto proteínas de apoptosis FGC (A), y las proteínas del grupo NP (B). El tamaño del punto representa el número de genes que participan para un término y cuán significativo es el dato de acuerdo con la gradiente de color azul-rojo, donde rojo presenta mayor significancia dado por $-\log_{10}(\text{FDR})$.

4.3.1 Red de interacción proteína-proteína de apoptosis.

En la red de IPP del conjunto de apoptosis FGC, se visualizaron las asociaciones de los nodos, con una confianza alta de 0,7. La proteína CASP3 presentó más interacciones, estas dadas por las proteínas CYCS, CASP6 y CAPN1 que participan en regulación de la función molecular y regulación de la actividad catalítica, al igual que PRKAR1A y PRKAR2A. Estas dos proteínas presentan funciones de actividad inhibidora de la proteína quinasa dependiente de AMPc, actividad inhibidora de proteína quinasa y unión de AMPc. CAPN1 y CASP6 tienen función de actividad endopeptidasa tipo cisteína, al igual que CASP3 que además tiene actividad inhibidora de proteína quinasa. CYSC no presenta una función conocida dentro del entramado (Figura 10).

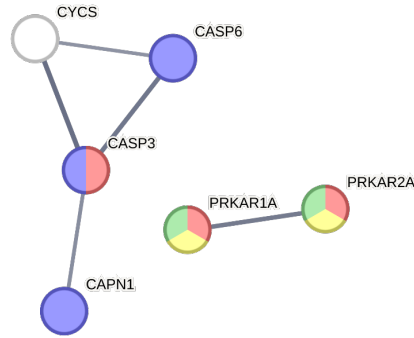


Figura 10. Red de IPP de apoptosis FGC. Representación gráfica de las principales funciones moleculares; de actividad inhibidora de la proteína quinasa dependiente de AMPc (color amarillo), actividad inhibidora de proteína quinasa (color rojo), unión de AMPc (color verde) y actividad endopeptidasa tipo cisteína (color azul). Se descartaron proteínas sin relación directa con la red, con confianza alta $\geq 0,7$.

4.4 Caracterización e Interacción entre proteínas de piroptosis.

En el conjunto de proteínas piroptosis FGC se encontraron un total de veintitrés genes codificantes de proteínas de MCR tipo piroptosis (Figura 2C). De las vías KEGG, el análisis de enriquecimiento destacó las vías de infección patógena por *Escherichia coli*, lípidos y aterosclerosis, infección por salmonela. También se observó las vías de muerte celular reguladas como apoptosis, necroptosis, formación de trampa extracelular de neutrófilos (Figura 11A). Las primeras tres vías nombradas se repiten como las principales destacadas en el conjunto de veinte proteínas del grupo NP presentes en piroptosis FGC (Figura 11B). Las otras tres proteínas que corresponden al grupo PG no se logró analizar en ShinyGO 0.80 por una acotada cantidad de datos.

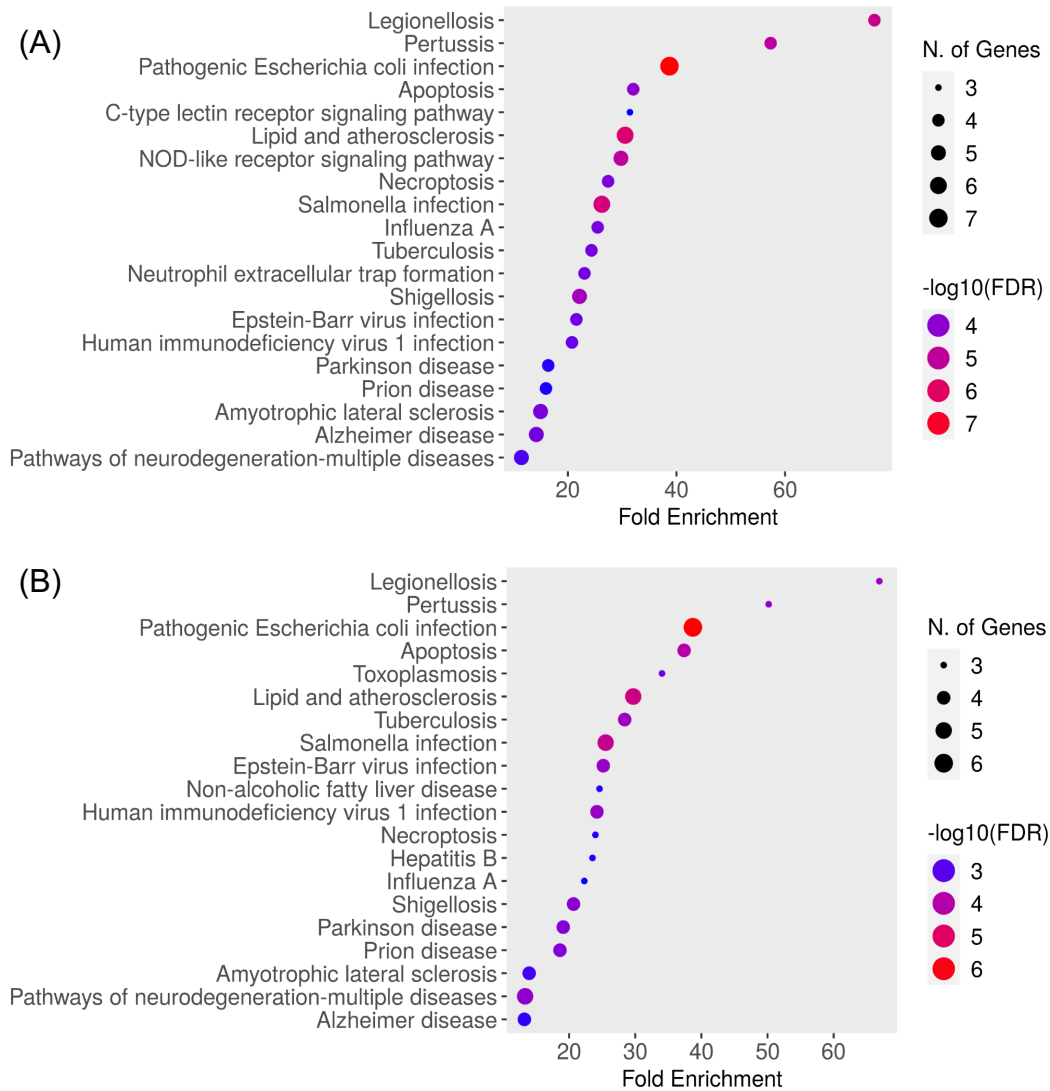


Figura 11. Términos enriquecidos GO de vías KEGG. Gráficos de puntos generados por ShinyGo 0.80. Se observan los términos GO más enriquecidos para el conjunto proteínas de piroptosis FGC (A) y para aquellas proteínas pertenecientes al grupo NP (B). El tamaño del punto representa el número de genes que participan para un término y con la gradiente de color azul-rojo, cuan significativo es el dato de acuerdo, donde rojo presenta mayor significancia dado por $-\log_{10}(\text{FDR})$.

En la categoría de procesos biológicos se observaron principalmente los procesos de respuesta a la sustancia orgánica, respuestas a estímulos químicos, respuesta a estímulos externos, respuestas al estrés, en procesos del sistema inmunológico, y regulación positiva del proceso metabólico de macromolecular (Figura 12A). De las veinte proteínas del grupo NP, nuevamente se repiten los procesos, siendo los

más destacados respuesta a sustancias orgánicas, respuesta a químicos, respuesta celular a sustancias orgánicas, etcétera (Figura 12B).

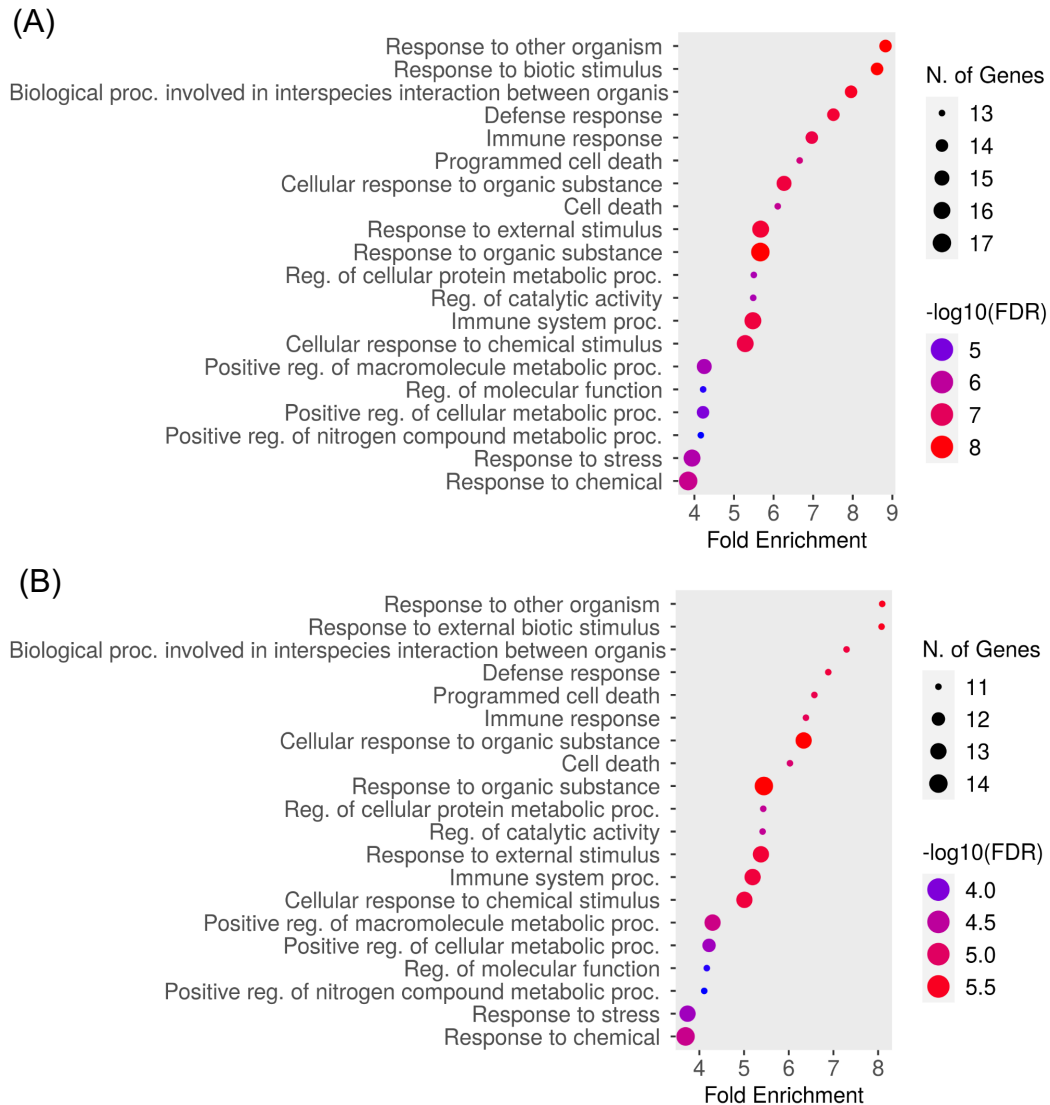


Figura 12. Términos enriquecidos GO de los procesos biológicos. Gráficos de puntos generados por ShinyGo 0.80. Se observan los términos GO más enriquecidos para el conjunto proteínas de piroptosis FGC (A), y de las proteínas del grupo NP (B). El tamaño del punto representa el número de genes que participan para un término y cuán significativo es el dato de acuerdo a la gradiente de color azul-rojo, donde rojo presenta mayor significancia dado por $-\log_{10}(\text{FDR})$.

Las funciones moleculares que destacar del conjunto piroptosis FGC son las proteínas de unión, como: unión de proteínas idénticas, unión de derivados de

carbohidratos, unión enzimática, unión a receptor de señalización, unión de derivados de carbohidratos y unión de ribonucleótidos. También se acentúa la actividad reguladora de la función molecular y actividad catalítica (Figura 13A). Del grupo NP las funciones moleculares son de unión de derivados de carbohidratos, unión compleja de proteínas, unión al receptor de señalización, unión enzimática, actividad catalítica que actúa sobre una proteína, actividad reguladora de la función molecular (Figura 13B).

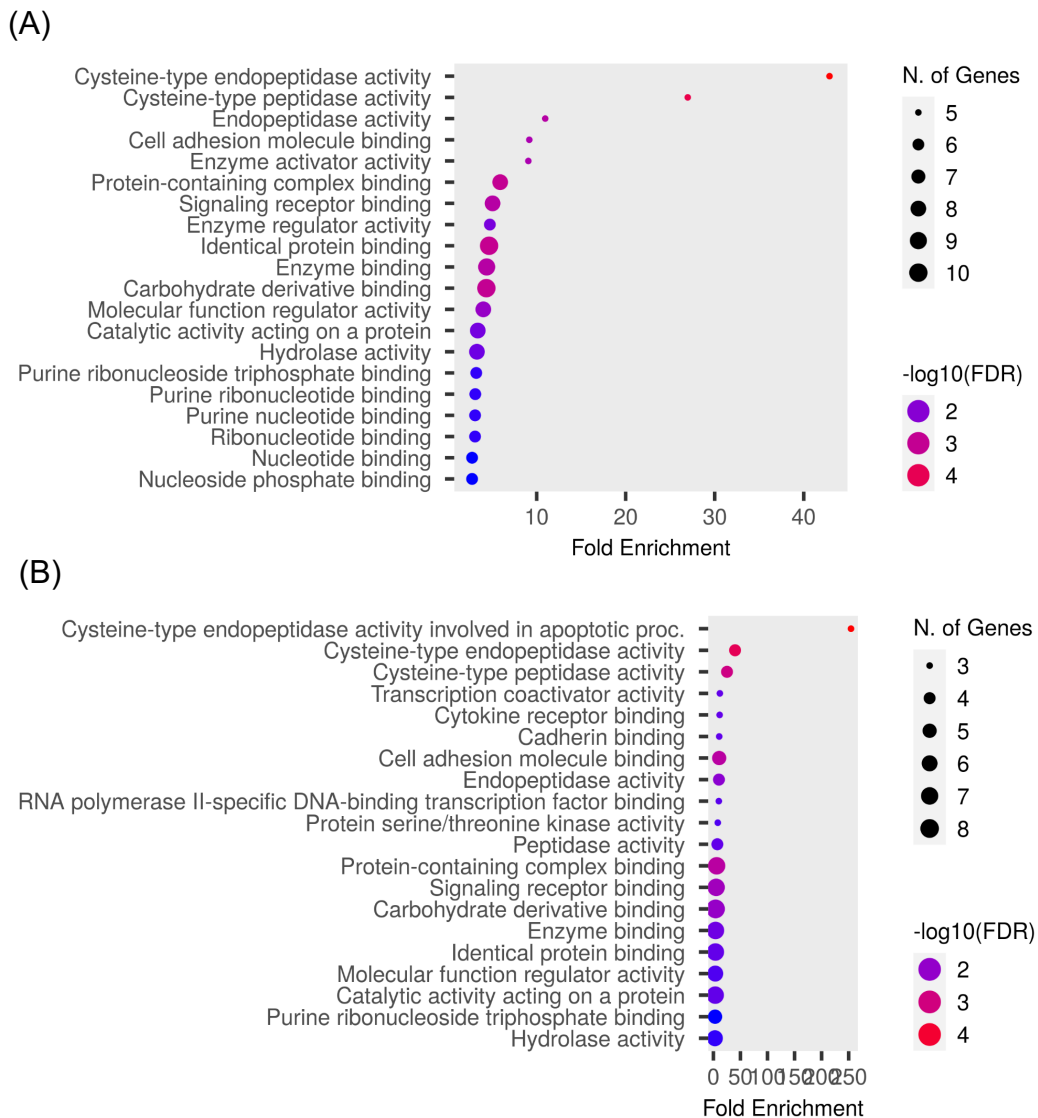


Figura 13. Términos enriquecidos GO de las funciones moleculares. Gráficos de puntos generados por ShinyGo 0.80. Se observan los términos GO más enriquecidos para el conjunto proteínas de piroptosis FGC (A), y de las proteínas del grupo NP (B). El tamaño

del punto representa el número de genes que participan para un término y cuan significativo es el dato de acuerdo con la gradiente de color azul-rojo, donde rojo presenta mayor significancia dado por $-\log_{10}(\text{FDR})$.

4.4.1 Red de interacción proteína - proteína de piroptosis.

La IPP de piroptosis FGC se destacó por presentar múltiples interacciones, el nodo de CASP3. Todas las proteínas presentan función de unión, pero algunas presentan distinciones en su función como la unión a proteína, unión a proteína idéntica y unión a enzimas. APOE y VTN presentaron solo conexión entre ellas, y sin vínculo directo con el entramado de proteínas, participan en varios procesos celulares como regulación de transporte, localización, diferenciación celular, regulación de la respuesta al estrés y regulación de la actividad catalítica. De esta red se destaca el proceso biológico de piroptosis las proteínas PYCARD, CASP1, CASP6 y ELANE (Figura 14).

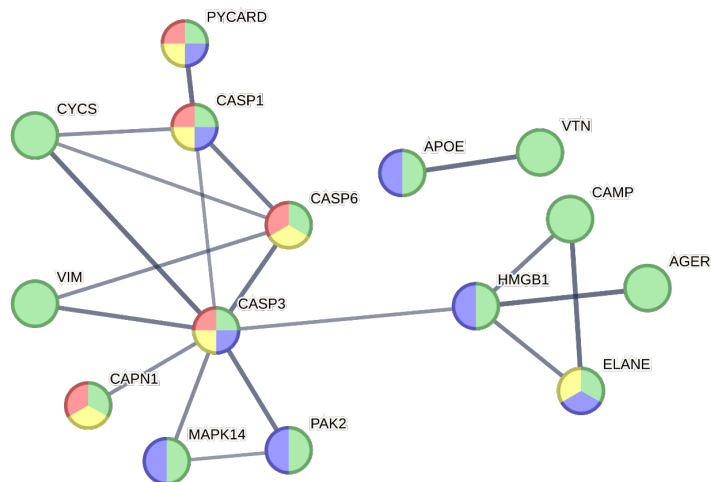
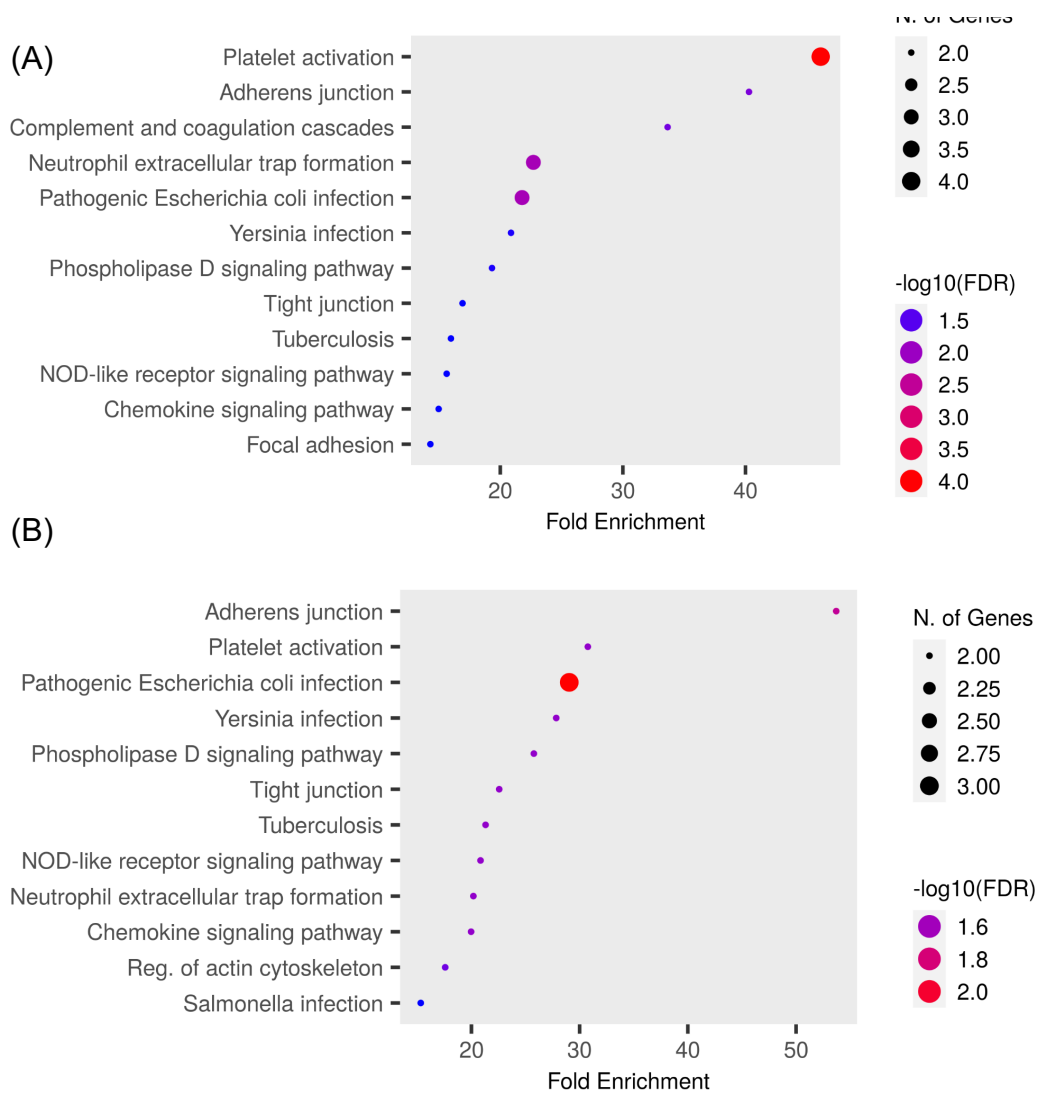


Figura 14. Red de IPP de piroptosis FGC. Representación gráfica de las principales funciones moleculares; de actividades endopeptidasa (color amarillo), actividades endopeptidasa tipo cisteína (color rojo), unión (color verde) y unión a enzima (color azul). Se descartaron proteínas sin relación directa con la red, con confianza alta $\geq 0,7$.

4.5 Caracterización e Interacción entre proteínas de netosis.

Se encontró un total de diecisiete proteínas del conjunto netosis FGC (Figura 2D). Se observó que dentro de las principales vías KEGG presentes, se resaltan la: activación plaquetaria, formación de trampas extracelular de neutrófilos, infección

patógena por *Escherichia coli*, unión adherente y cascada de complemento y coagulación (Figura 15A). Del conjunto netosis FGC, trece proteínas pertenecen al grupo NP y presentan participación en las vías de infección patógena por *Escherichia coli*, unión adherente, vías de señalización de quimiocinas, vías de señalización de la fosfolipasa D, actuación plaquetaria, formación de trampas extracelulares de neutrófilos (Figura 15B). En el grupo de PG está conformado por cuatro proteínas del conjunto global, donde solo están presente cuatro vías, la principal es de actuación plaquetaria, seguida por la cascada de complemento y coagulación, interacción ECM-receptor y vía de señalización de IL-17 (Figura 15C).



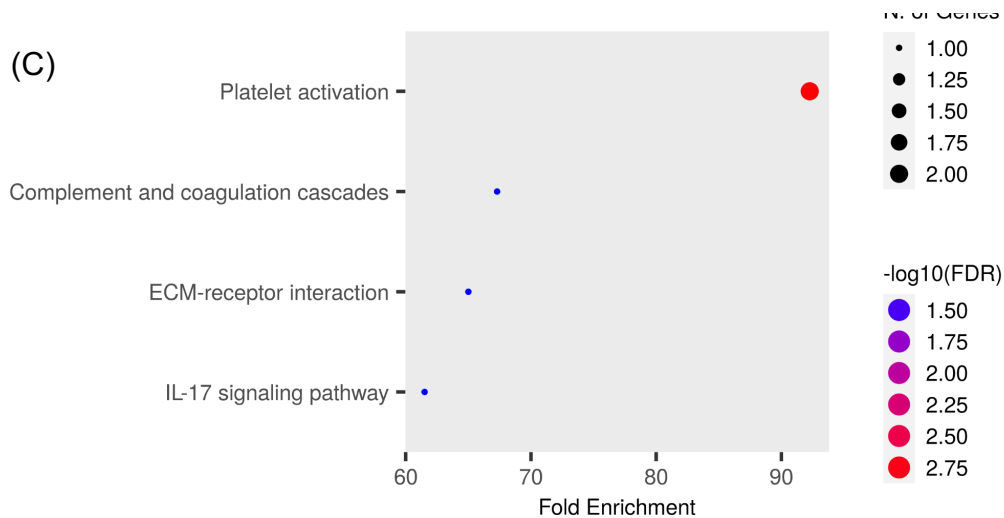


Figura 15. Términos enriquecidos GO de vías KEGG. Gráficos de puntos generados por ShinyGo 0.80. Se observan los términos GO más enriquecidos para el conjunto proteínas de netosis FGC (A), y de las proteínas del grupo NP (B) y grupo PG (C). El tamaño del punto representa el número de genes que participan para un término y cuán significativo es el dato de acuerdo con la gradiente de color azul-rojo, donde rojo presenta mayor significancia dado por $-\log_{10}(\text{FDR})$.

En los procesos celulares de netosis FGC, se acentúan los procesos de respuesta al estrés, regulación positiva de la respuesta al estímulo, respuesta a estímulos externos, activación celular, regulación de procesos metabólicos de las proteínas, y proceso del sistema inmunológico (Figura 16A). En cuanto a las trece proteínas del grupo NP se destaca respuesta a estímulos externos, regulación del proceso de organismo multicelular, respuesta al estrés, activación celular, regulación del proceso metabólico de las proteínas celulares y regulación positiva de respuesta al estímulo (Figura 16B). Las cuatro proteínas del grupo PG presentaron procesos de respuesta al estrés, adhesión celular, regulación positiva al estímulo, respuesta inmune humoral, coagulación de la sangre, hemostasia, activación plaquetaria, adhesión al sustrato celular y cicatrización de heridas (Figura 16C).

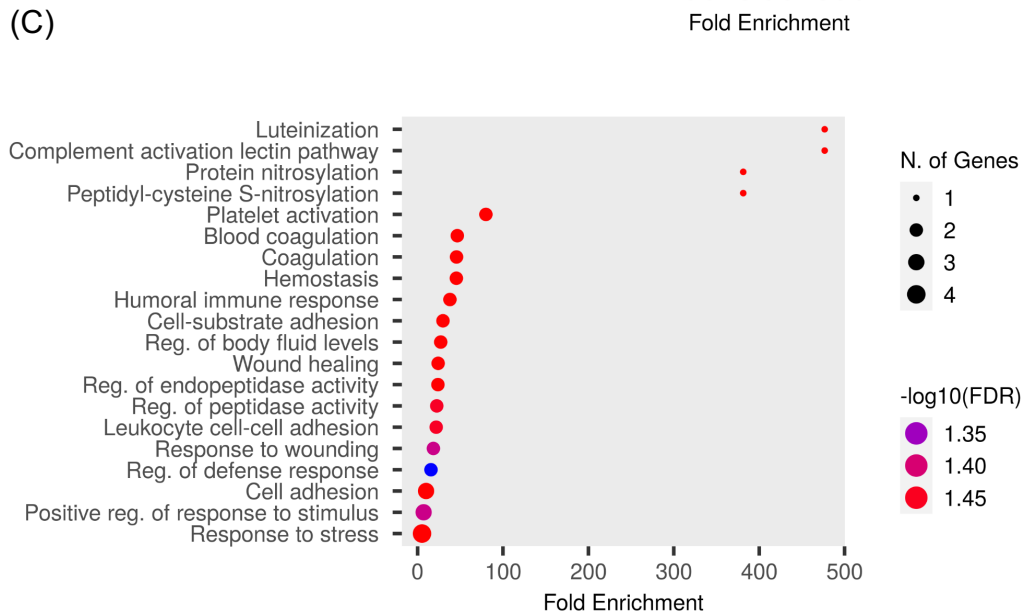
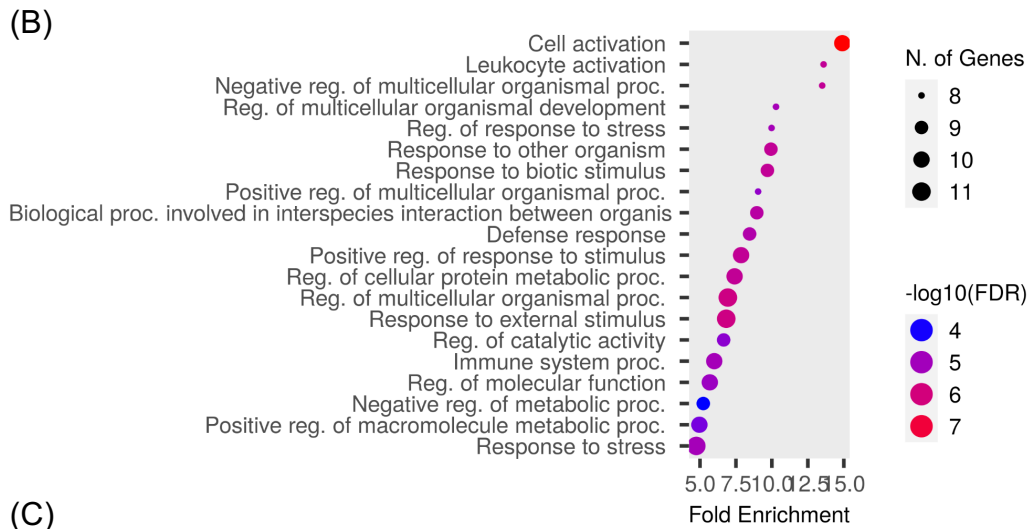
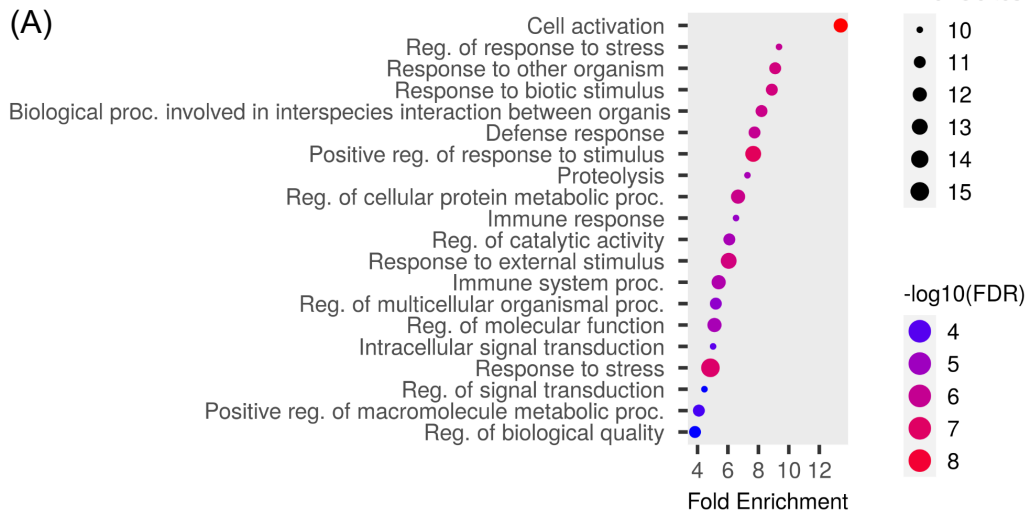
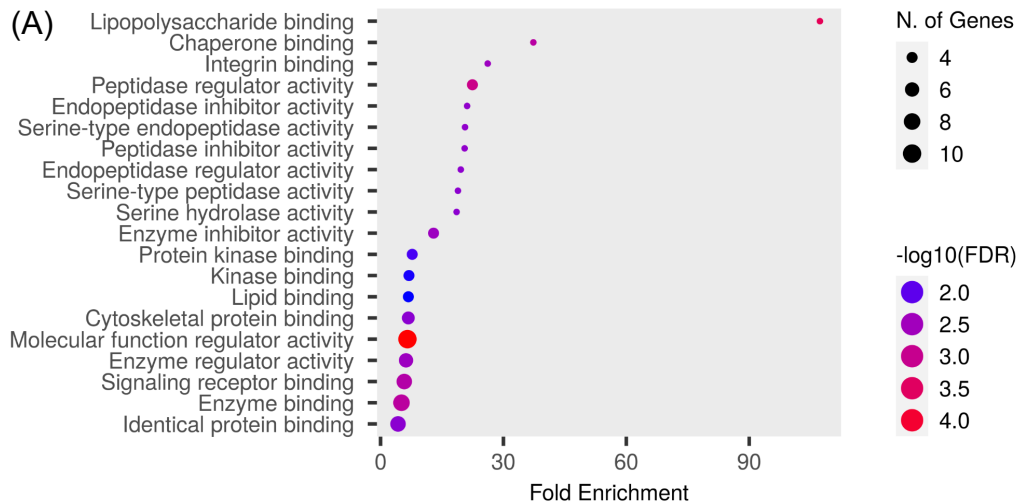


Figura 16. Términos enriquecidos GO de los procesos biológicos. Gráficos de puntos generados por ShinyGo 0.80. Se observan los términos GO más enriquecidos para el conjunto proteínas de netosis FGC (A), y de las proteínas del grupo NP (B) y grupo PG (C). El tamaño del punto representa el número de genes que participan para un término y cuanto significativo es el dato de acuerdo con la gradiente de color azul-rojo, donde rojo presenta mayor significancia dado por $-\log_{10}(\text{FDR})$.

Las funciones moleculares presentes en netosis FGC son principalmente de: actividad reguladora de la función molecular, unión enzimática, unión al receptor de señalización, unión de proteínas idénticas, actividad reguladora enzimática y unión a proteínas citoesqueléticas (Figura 17A). Las funciones presentes en el grupo NP y que sobresalen son de: actividad reguladora de la función molecular, unión enzimática, actividad reguladora enzimática, unión de proteínas idénticas, unión de proteínas quinasa, unión a proteínas citoesqueléticas y unión a lipopolisacáridos (Figura 17B). Del grupo PG se acentúan las funciones de: unión al receptor de señalización, unión a proteínas dependientes de calcio, unión de proteasa, unión de integrina y unión de moléculas de adhesión celular (Figura 17C).



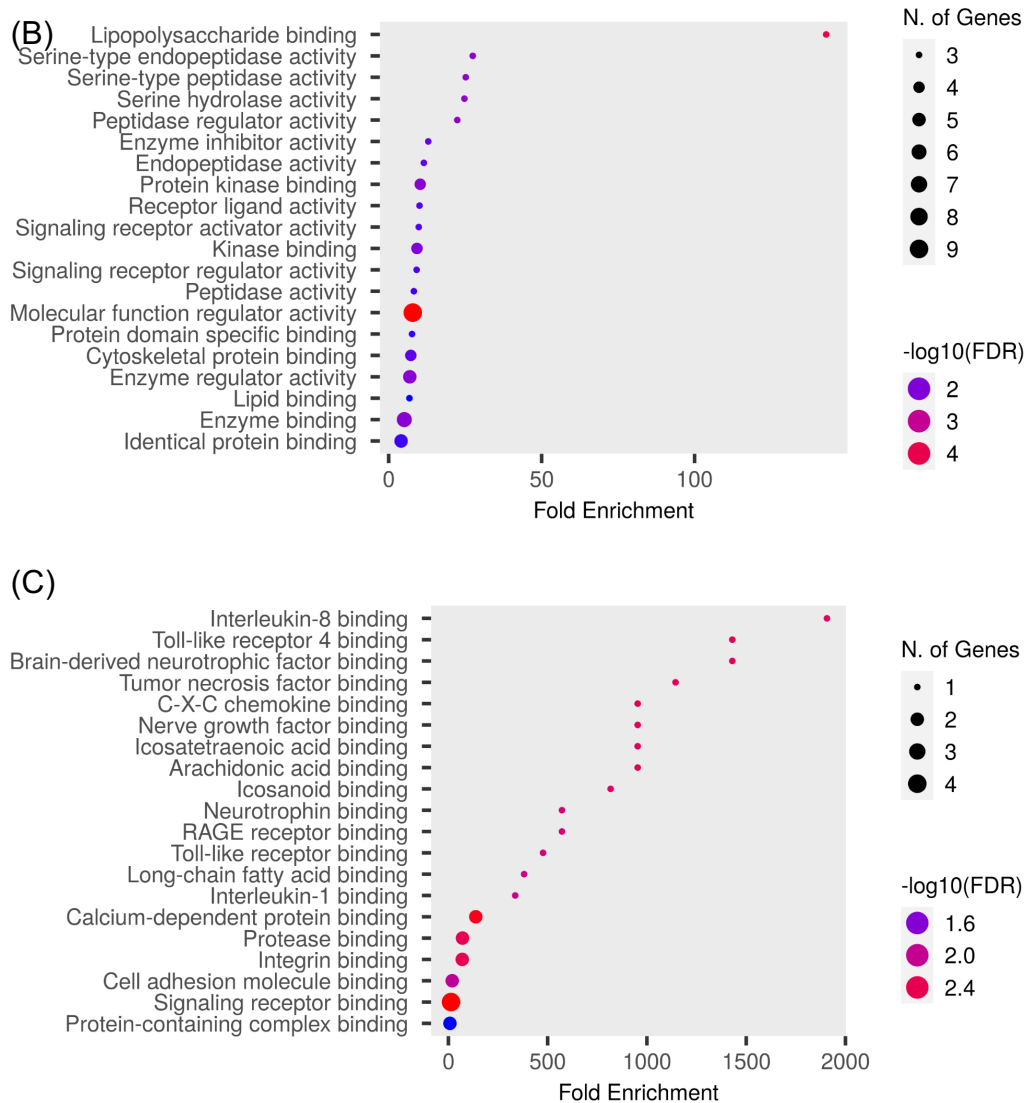


Figura 17. Términos enriquecidos GO de las funciones moleculares. Gráficos de puntos generados por ShinyGo 0.80. Se observan los términos GO más enriquecidos para el conjunto proteínas de netosis FGC (A), y de las proteínas del grupo NP (B) y grupo PG (C). El tamaño del punto representa el número de genes que participan para un término y cuán significativo es el dato de acuerdo con la gradiente de color azul-rojo, donde rojo presenta mayor significancia dado por $-\log_{10}(\text{FDR})$.

4.5.1 Red de interacción proteína - proteína de netosis.

La red de IPP se visualizó las funciones moleculares que comparten las proteínas, como la actividad reguladora de la función molecular, actividad reguladora de peptidasa, unión de lipopolisacáridos y unión de quimiocinas CXC. El nodo de la proteína CAMP une a los nodos del entramado, y junto a HMGB1, S100A9, MMP-8

y RHOA participan en la desgranulación de neutrófilos, Los nodos Vwf, F2, A2M y RHOA contribuye en la activación, señalización y agregación plaquetaria. MMP-8, A2M y VWF cooperan con la organización de la matriz extracelular, reacciones necesarias para la MCR tipo netosis (Figura 18).

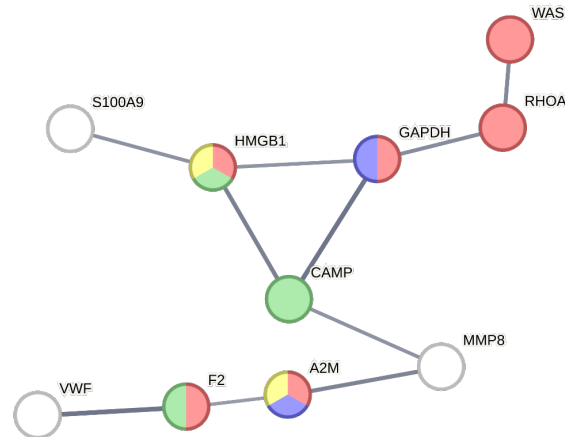


Figura 18. Red de IPP de netosis FGC. Representación gráfica de las principales funciones moleculares; unión de quimiocinas CXC (color amarillo), actividad reguladora de la función molecular (color rojo), unión de lipopolisacáridos (color verde) y actividad reguladora de peptidasa (color azul). Se descartaron proteínas sin relación directa con la red, con confianza alta $\geq 0,7$.

4.6 Caracterización e Interacción entre proteínas de necroptosis.

Se halló un total de treinta y seis proteínas de necroptosis FGC (Figura 2E). Dentro de las vías KEGG presente en este conjunto de datos, sobresale la ruta de necroptosis, luego es seguida por las vías de señalización del receptor tipo NOD, lípidos y aterosclerosis, enfermedad por coronavirus-COVID-19, vías metabólicas, y enfermedad priónica (Figura 19A). Las vías KEGG presentes en el grupo NP continúa destacando la ruta de necroptosis, seguida por vías metabólicas, vías de señalización del receptor tipo NOD (Figura 19B). Del grupo PG persisten las rutas nombradas sobresaliendo principalmente la de necroptosis (Figura 19C).

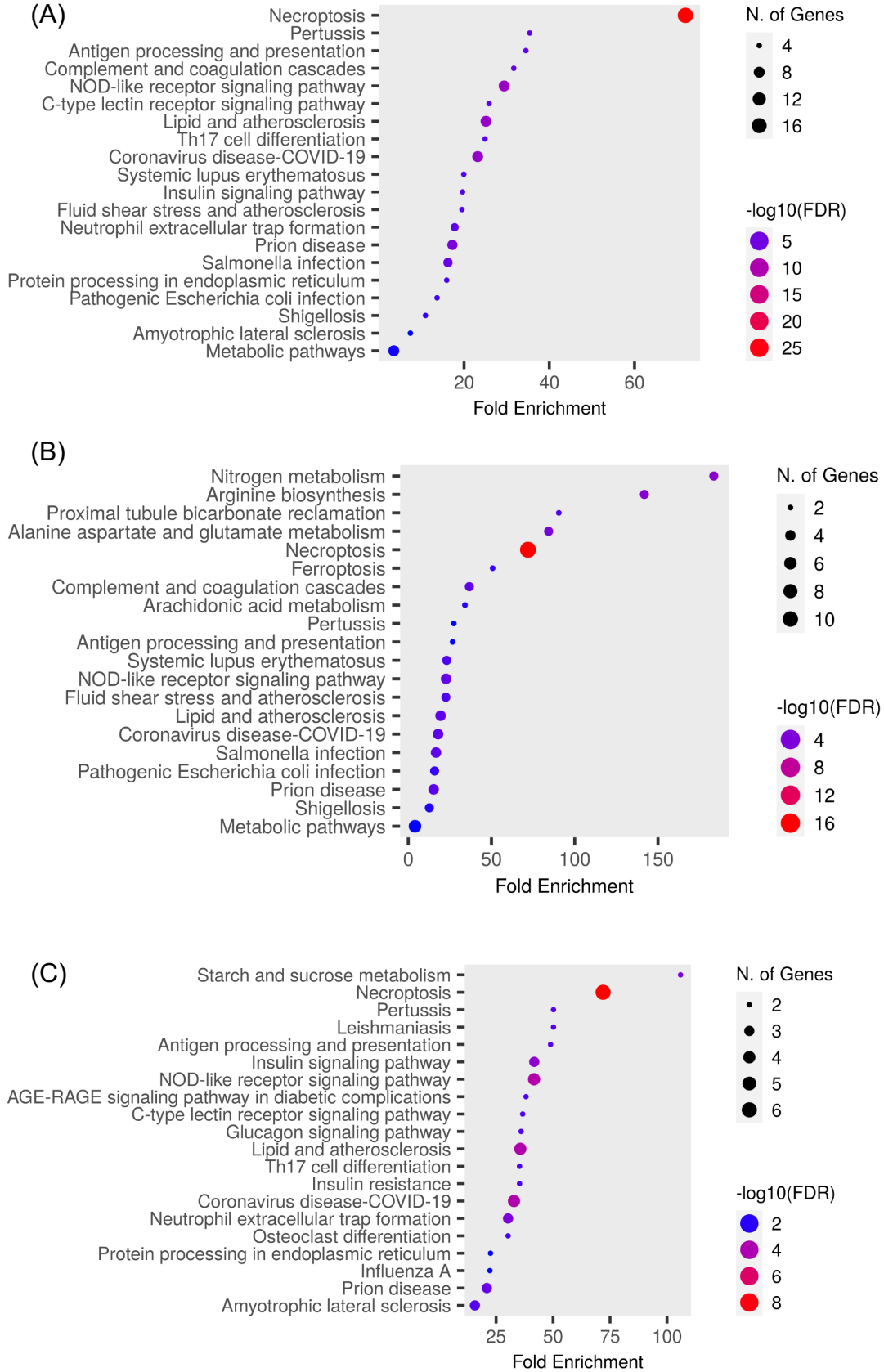
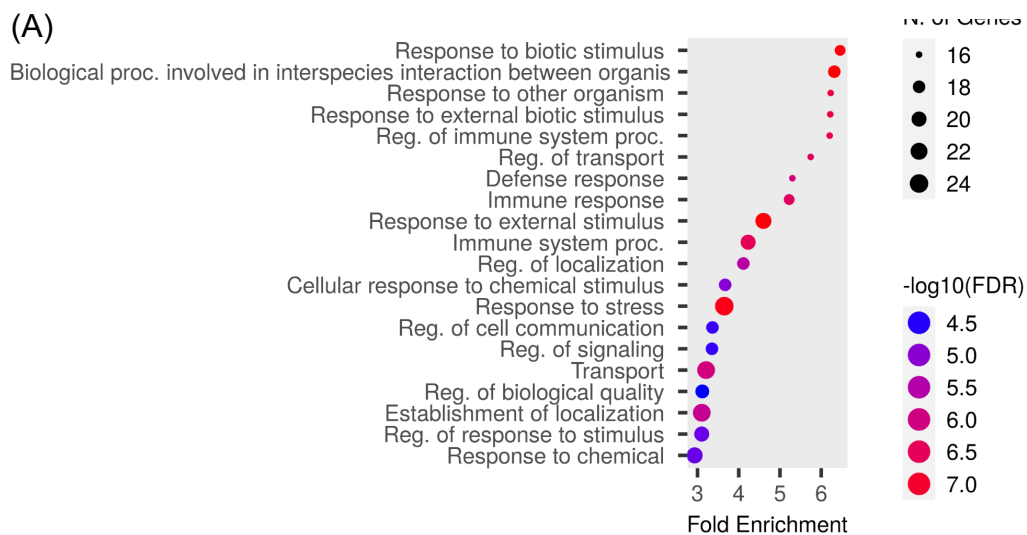


Figura 19. Términos enriquecidos GO de vías KEGG. Gráficos de puntos generados por ShinyGo 0.80. Se observan los términos GO más enriquecidos para el conjunto proteínas de necroptosis FGC (A), y de las proteínas del grupo NP (B) y grupo PG (C). El tamaño del punto representa el número de genes que participan para un término y cuan significativo es el dato de acuerdo con la gradiente de color azul-rojo, donde rojo presenta mayor significancia dado por $-\log_{10}(\text{FDR})$.

Los procesos biológicos que destacan al conjunto necroptosis FGC son de respuesta al estrés, transporte, establecimiento de localización, respuesta al estímulo externo, respuesta a la sustancia química, procesos del sistema inmunológico, regulación de respuesta el estímulo, regulación de la calidad biológica y procesos biológicos involucrado en la interacción entre especies de organismos (Figura 20A). En el grupo NP se destacan los procesos de regulación de la calidad biológica, transporte, establecimiento de localización, respuesta al estrés, regulación de la respuesta al estímulo, regulación del transporte, regulación de la localización, respuesta al estímulo externo (Figura 20B). De los procesos principales del grupo PG resaltan, respuesta al estímulo externo, respuesta al estrés, respuesta a la química, respuesta a estímulos bióticos, procesos del sistema inmunológico, respuesta celular al estímulo químico, respuesta de defensa a otro organismo (Figura 20. C).



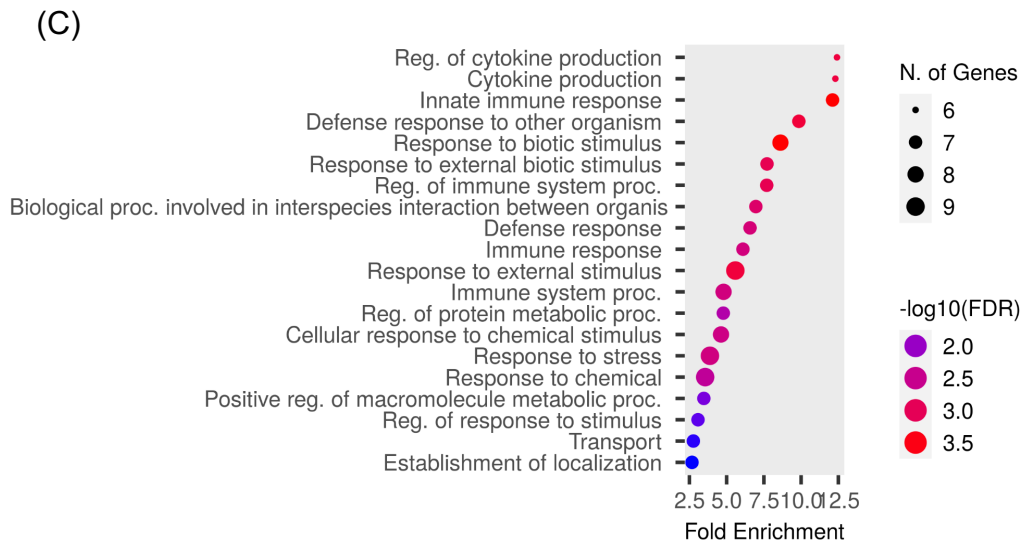
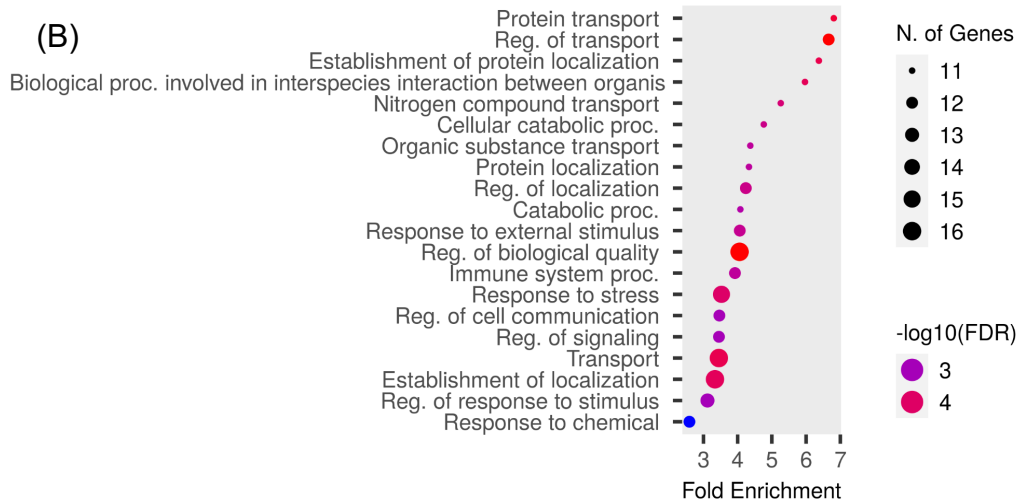
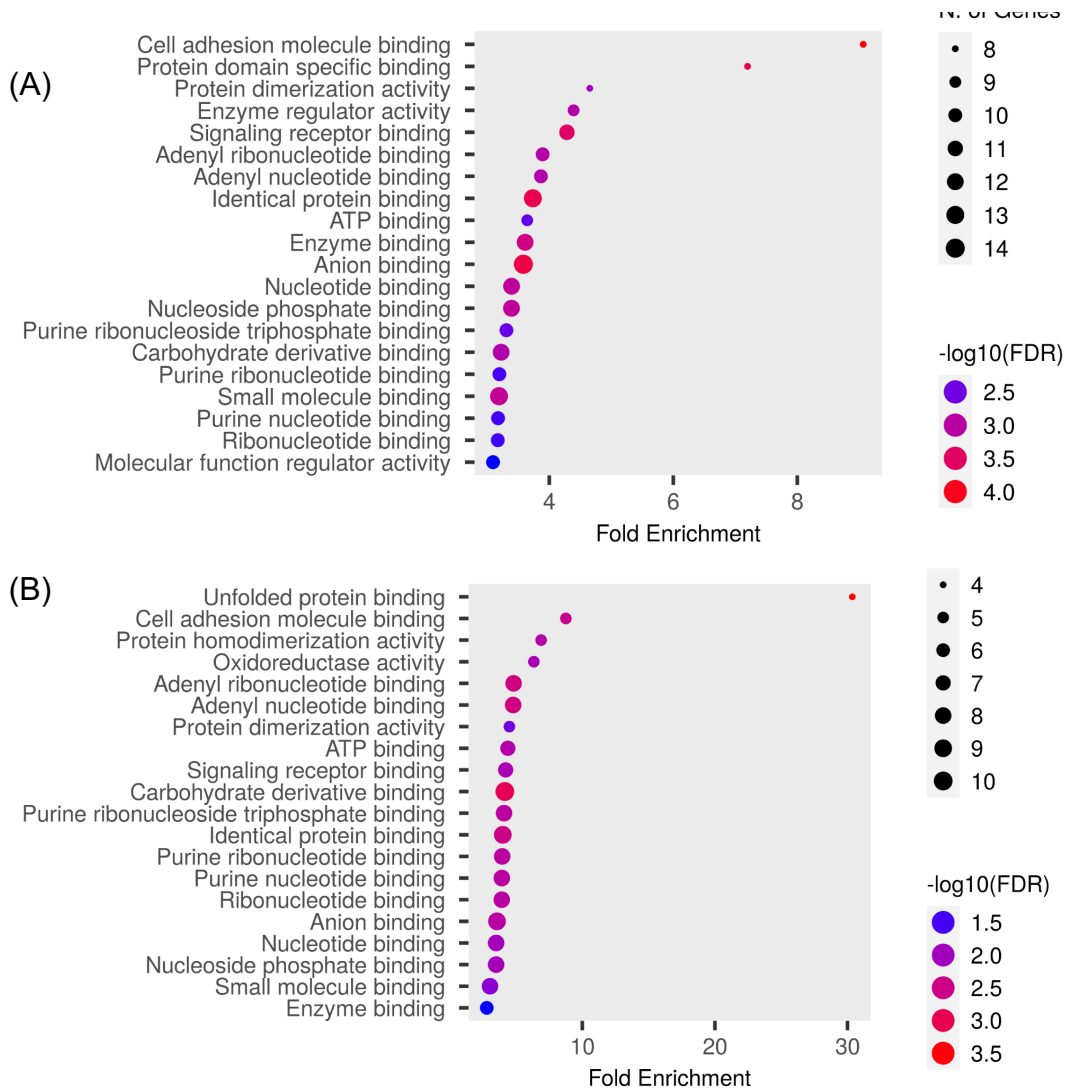


Figura 20. Términos enriquecidos GO de los procesos biológicos. Gráficos de puntos generados por ShinyGo 0.80. Se observan los términos GO más enriquecidos para el conjunto proteínas de necroptosis FGC (A), y de las proteínas del grupo NP (B) y grupo PG (C). El tamaño del punto representa el número de genes que participan para un término y cuán significativo es el dato de acuerdo con la gradiente de color azul-rojo, donde rojo presenta mayor significancia dado por $-\log_{10}(\text{FDR})$.

Las funciones moleculares que destacan en necroptosis FGC son de unión a aniones, unión a proteínas idénticas, unión de moléculas pequeñas, unión enzimática, unión de nucleótidos, unión de nucleótidos fosfatos, unión de derivados de carbohidratos (Figura 21A). En el grupo de NP son principalmente las funciones de unión de derivados de carbohidratos, unión de proteínas idénticas, unión de

aniones, unión de nucleótidos de adenilo, unión de ribonucleótido y unión de nucleótidos de purina (Figura 21B). Del grupo PG destacan la unión enzimática, unión específica del dominio proteína, actividad reguladora enzimática, actividad reguladora de la función molecular, unión de aniones, unión a moléculas pequeñas y unión de proteína fosfatasa (Figura 21C).



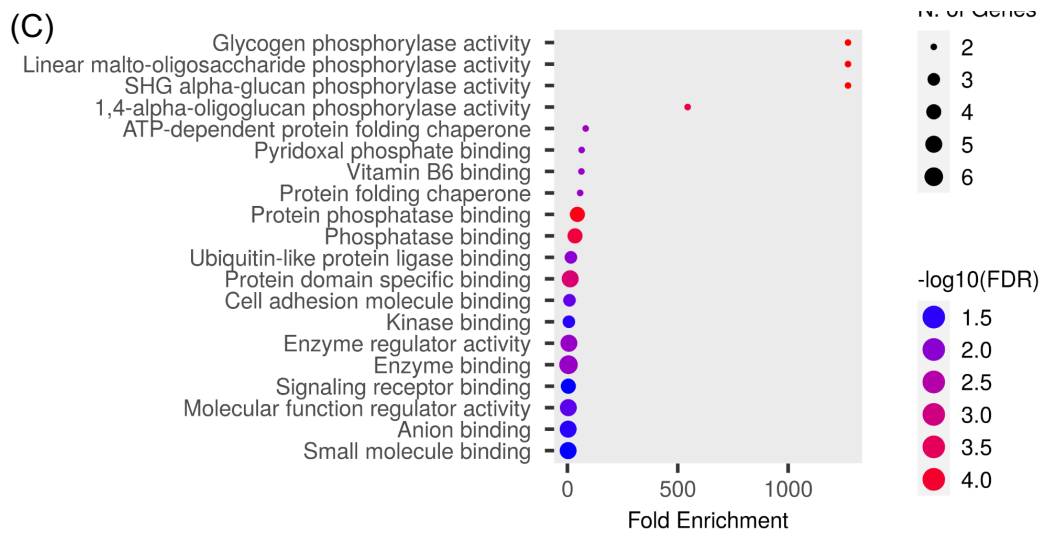


Figura 21. Términos enriquecidos GO de las funciones moleculares. Gráficos de puntos generados por ShinyGo 0.80. Se observan los términos GO más enriquecidos para el conjunto proteínas de necroptosis FGC (A), y de las proteínas del grupo NP (B) y grupo PG (C). El tamaño del punto representa el número de genes que participan para un término y cuan significativo es el dato de acuerdo con la gradiente de color azul-rojo, donde rojo presenta mayor significancia dado por $-\log_{10}(\text{FDR})$.

4.6.1 Red de interacción proteína-proteína de necroptosis.

En la red de IPP de necroptosis FGC, se distinguió dentro del entramado la proteína HSP90AA1 ya que conecta varios nodos con gran solidez, participa en múltiples procesos biológicos como respuesta ante estímulos de estrés y químicos, regulación positiva de proceso celular y biológico, regulación de la señal y comunicación de células.

Se observaron las funciones moleculares presentes en los nodos, como las de unión a proteínas, actividad catalítica, unión aniónica, unión a proteína idéntica y unión de derivados de carbohidratos (Figura 22). En las vías KEGG de necroptosis participan las proteínas PPIA, HSP90AB1, HSP90AA1, HMGB1, STAT1, CASP1, PYCARD, PYGB, PYGL, PYGM, CAPN1, FTH1, GLUD2, GLUL y GLUD1. En relación a enfermedades priónicas están implicados los nodos de HSPA5, C6, C9, C7, C5, MAPK14 y CYBB.

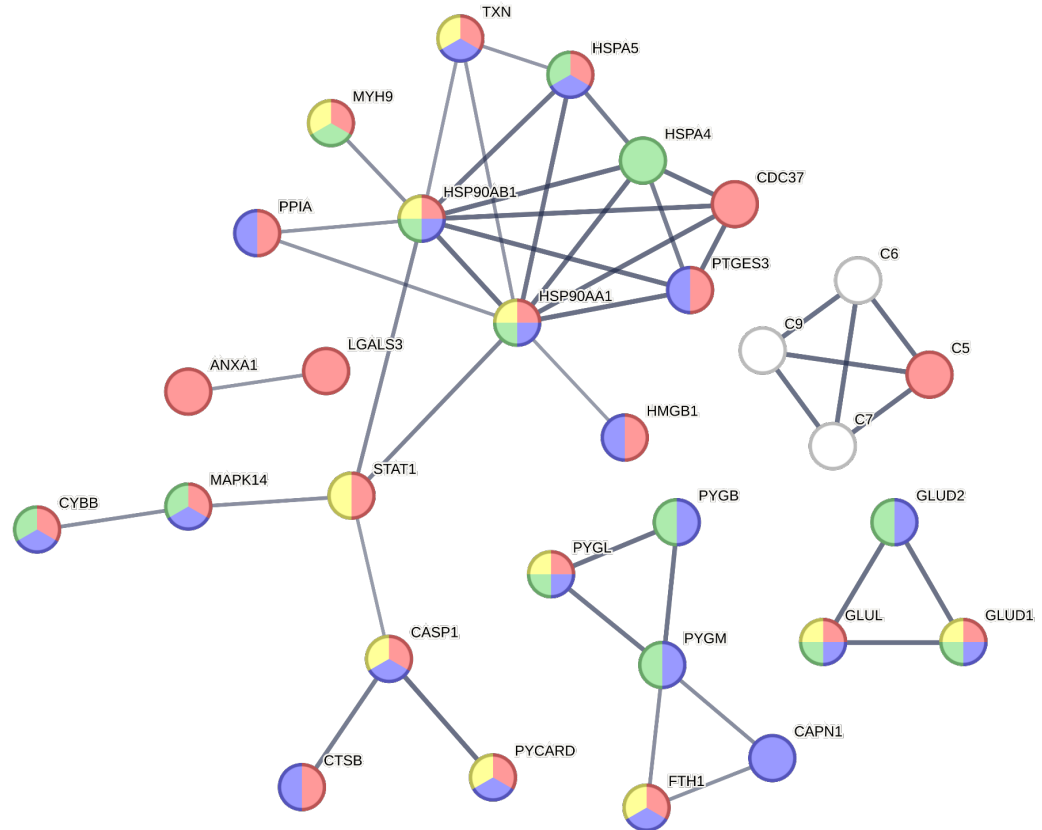


Figura 22. Red de IPP de necroptosis FGC. Representación gráfica de las principales funciones moleculares; unión a proteína idéntica (color amarillo), unión a proteína (color rojo), unión aniónica (color verde), actividad catalítica (color azul) y unión de derivados de carbohidratos (color rosado). Se descartaron proteínas sin relación directa con la red, con confianza alta $\geq 0,7$.

4.7 Comportamiento de la expresión de proteínas con una diferencia significativa para cada MCR, dentro del proteoma FGC.

Para complementar la comprensión del comportamiento de las proteínas con una diferencia significativa en cada MCR, se realizó la comparación de los perfiles proteicos entre el grupo no progresión y progresión de la periodontitis.

Al ordenarlas de menor a mayor las abundancias relativas del proteoma, se comparó el grupo NP con el grupo PG obteniendo una diferencia estadísticamente significativa, donde el grupo NP fue mayor que la del grupo PG (prueba Mann Whitney de dos colas, $p < 0,05$) (Figura 23A). Al separar las abundancias relativas

de las proteínas obtenidas en grupo NP y observar aquellas que se expresan de forma exclusiva y presentan abundancias relativamente bajas ubicándose en la mitad inferior de la curva S (Figura 23B), este fenómeno ocurre de igual manera en las proteínas del grupo PG (Figura 23C).

Se observó la abundancia relativa dentro del proteoma FGC de cada proteína, con una diferencia estadísticamente significativa, en las cinco MCR, diferenciando el perfil proteico del grupo NP y PG. En ferroptosis se visualizó que la proteína FTH1 que presentó la menor abundancia relativa (18.49) y se expresa de forma exclusiva en NP (Figura 23D), y con la mayor abundancia PRDX1 (26.75), igualmente SNCA presentó abundancia relativa baja (19.15) y fue la única proteína que se expresó de forma exclusiva y significativa en el grupo PG (media=19.89) (Figura 23E). Dentro de la MCR tipo apoptosis se observó dos proteínas con diferencia significativas; CASP6 (19.19) ubicado bajo la media (media=20.18) y PRKAR1A (20.19) levemente sobre la media del proteoma del grupo NP (Figura 23F). En la piroptosis se visualizó otra proteína exclusiva del grupo NP, ADORA2A con abundancia baja (16.96) y con la mayor abundancia relativa del conjunto PKM (26.98) (Figura 23G). Dentro conjunto de netosis, el perfil proteico de NP se obtuvo proteínas con mayor abundancia, desde SERPINB1 (21.87), hasta un máximo de abundancia relativa logrado por GAPDH (27,31) (Figura 23H). Por último, en las proteínas de necroptosis, también se expresó la proteína exclusiva FTH1, y con mayor abundancia relativa del conjunto, PPIA (27.00) (Figura 23.I).

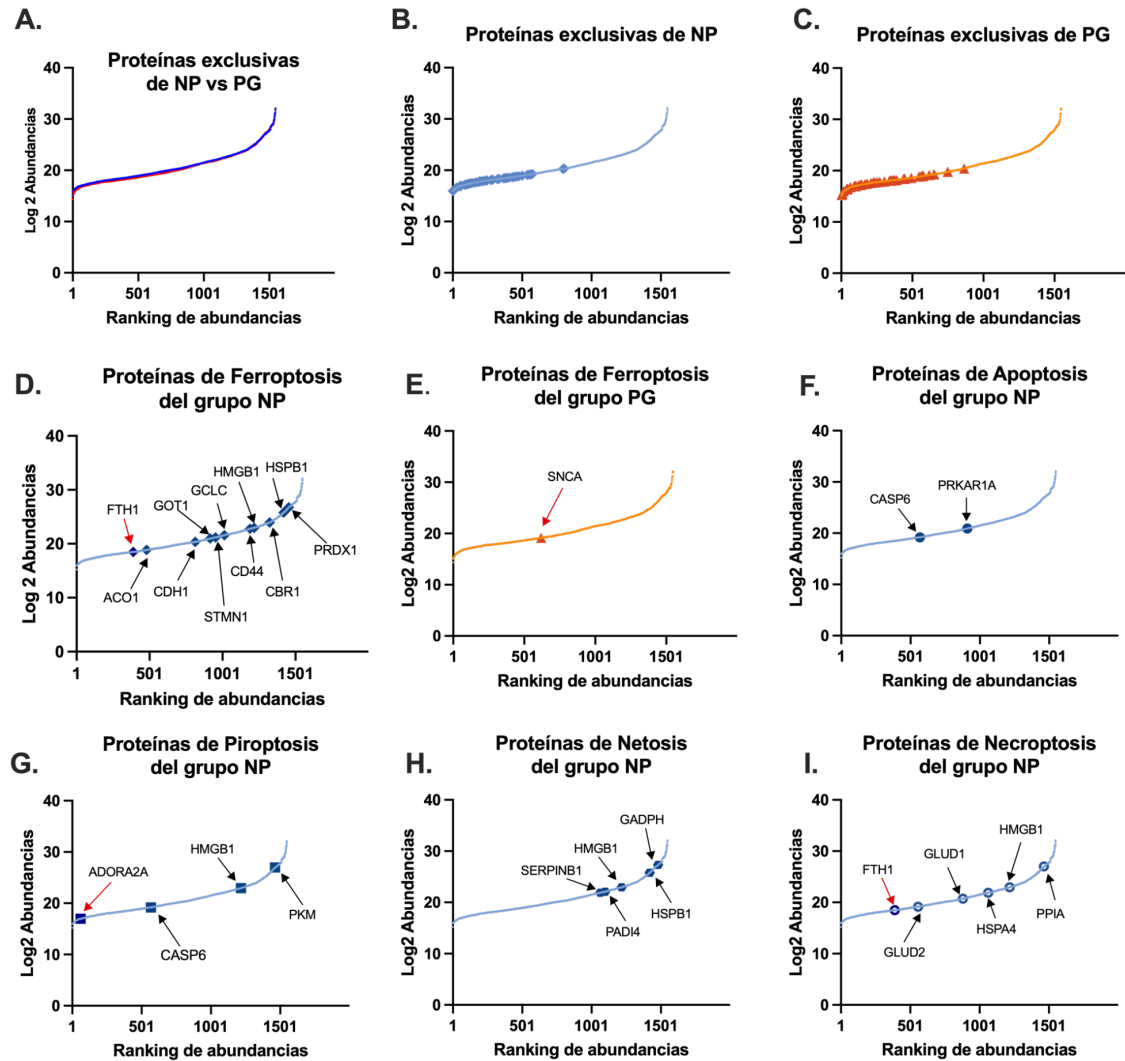


Figura 23. Comparación de perfiles proteicos entre grupos NP y PG. Gráfico en S de las abundancias relativas de proteínas transformada en logaritmo (\log_2) de las 1600 proteínas identificadas en el proteoma del FGC. A. Comparación de las abundancias relativas del proteoma del grupo NP (azul) versus grupo PG (rojo). B. Visualización de la ubicación según abundancia de las proteínas exclusivas del grupo NP, destacadas con la figura de rombo. C. Visualización de la ubicación según abundancia de las proteínas exclusivas del grupo PG, destacadas con la figura de triángulos. D. Representación de las proteínas con diferencia significativas de ferroptosis, destacando con flechas negras las proteínas más abundantes y con rojo la exclusiva del grupo NP. E. Representación de las proteínas con diferencia significativas de ferroptosis, destacando con flecha roja la proteína exclusiva del grupo PG. F. Representación de las proteínas con diferencia significativas de apoptosis, destacando con flechas negras las proteínas más abundantes del grupo NP. G. Representación de las proteínas con diferencia significativas de piroptosis, destacando con

flechas negras las proteínas más abundantes del grupo NP. H. Representación de las proteínas con diferencia significativa de netosis, destacando con flechas negras las proteínas más abundantes del grupo NP. I. Representación de las proteínas con diferencia significativa de necroptosis, destacando con flechas negras las proteínas más abundantes del grupo NP.

Con la información obtenida del análisis *in silico* se realizó una recopilación de las funciones moleculares (GO) para cada proteína con diferencia estadísticamente significativa dentro del proteoma del FGC, que participan de las MCR tipo ferroptosis, apoptosis, piroptosis, netosis y necroptosis (Tabla 2), identificando el rol de la proteína en la muerte celular regulada, señalando la sobrerrepresentación en el grupo de PG o NP, otorgado por su abundancia relativa presente en el FGC.

Tabla 2. Funciones moleculares (GO) actualmente conocidas de las proteínas sobrerrepresentadas de las cinco MCR dentro del proteoma del FGC. Tabla elaborada en base a datos de UniProt (UniProt, 2018).

Proteínas ferroptosis					
Nombre del gen	Nombre de la proteína	Relación de abundancia	Función molecular (GO)	Rol	
FTH1	Cadena pesada de ferritina	E en NP*	Actividad secuestradora de iones de hierro	M. I.	
HSPB1	Proteína de choque térmico miembro 1 de la familia B (pequeña)	SE en NP*	Chaperona de plegamiento de proteínas; unión a proteína idéntica; unión a proteína quinasa; unión a ARN.	M. I.	
HMGB1	Grupo de alta movilidad caja 1	SE en NP*	Unión de lipopolisacárido; actividad de citoquinas; unión de ARN; actividad liasa; actividad quimioatrayente.	P.	
GCLC	Subunidad catalítica de glutamato-cisteína ligasa	SE en NP	Unión ADP; unión de ATP; unión de glutamato; unión de iones de magnesio; actividad glutamato-cisteína ligasa	I.	
STMN1	Estatmina	SE en NP	Unión de tubulina	I.	

PRDX1	Peroxiredoxina-1	SE en NP	Unión de ARN; actividad peroxidasa; unión de cadherina; actividad de tioredoxina peroxidasa.	I.
CD44	Antígeno CD44	SE en NP	Unión de colágeno; actividad del receptor de señalización transmembrana; actividad del receptor de citoquinas	I.
CDH1	Cadherina 1	SE en NP	Unión de cadherina; unión de iones calcio; unión a proteína tirosina quinasa	I.
SNCA	Alfa sinucleína	E en PG*	Actividad oxirreductasa; unión de hierro ferroso; unión de iones cuprosos; unión de iones calcio; unión de alfa-tubulina; unión de actina; unión de iones de zinc	P.
GOT1	Transaminasa glutámico-oxalacética 1	SE en NP	Actividad de L-cisteína transaminasa; L-aspartato: actividad 2-oxoglutarato aminotransferasa	I.
ACO1	Aconitasa 1	SE en NP	Unión de ARN; unión de elementos sensibles al hierro; actividad aconitato hidratasa; 4 hierro, 4 enlaces de azufre	P.
CBR1	Carbonil Reductasa 1	SE en NP	Actividad de la prostaglandina E2 9-reductasa; actividad oxidoreductasa, actuando sobre el grupo CH-OH de los donantes, NAD o NADP como aceptor.	SC.

Proteínas apoptosis

CASP6	Caspasa 6	SE en NP	Actividad endopeptidasa tipo cisteína; unión de proteínas idénticas	P.
-------	-----------	----------	---	----

PRKAR1A	subunidad reguladora alfa de proteína quinasa tipo I dependiente de AMPc.	SE en NP	Unión de AMPc; Actividad reguladora de la proteína quinasa dependiente de AMPc; unión de la subunidad catalítica de la proteína quinasa A; unión de la proteína ligasa de ubiquitina.	I.
---------	---	----------	---	----

Proteínas piroptosis

Nombre del gen	Nombre de la proteína	Relación de abundancia	Función molecular (GO)	Rol
ADORA2A	Receptor de adenosina A2a	SE en NP	Actividad del receptor de adenosina acoplado a proteína G; unión alfa-actinina	P.
HMGB1	Grupo de alta movilidad caja 1	SE en NP	Unión de lipopolisacárido; actividad de citoquinas; unión de ARN; actividad liasa; actividad quimioatrayente.	P.
PKM	Piruvato quinasa M1/2	SE en NP	Unión de ATP; actividad de la proteína tirosina quinasa; actividad de piruvato quinasa; unión a un complejo mayor de histocompatibilidad de clase II; unión de ARNm	P.
CASP6	Caspasa 6	SE en NP	Actividad endopeptidasa tipo cisteína; unión de proteínas idénticas	P.

Proteínas netosis

Nombre del gen	Nombre de la proteína	Relación de abundancia	Función molecular (GO)	Rol
HSPB1	Proteína de choque térmico miembro 1 de la familia B (pequeña)	SE en NP	Chaperona de plegamiento de proteínas; unión a proteína idéntica; unión a proteína quinasa; unión a ARN.	SC.

HMGB1	Grupo de alta movilidad caja 1	SE en NP	Unión de lipopolisacárido; actividad de citoquinas; unión de ARN; actividad liasa; actividad quimioatrayente.	P.
PADI4	Peptidil arginina deiminasa 4	SE en NP	Unión de iones calcio; actividad histona arginina deiminasa; unión idéntica a proteínas.	P.
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	SE en NP	Actividad (fosforilante) de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (NAD ⁺); unión de microtúbulos.	I.
SERPINB1	Miembro 1 de la familia B de serpin	SE en NP	Actividad inhibidora de peptidasa; actividad inhibidora de la endopeptidasa tipo serina.	I.

Proteínas necroptosis

Nombre del gen	Nombre de la proteína	Relación de abundancia	Función molecular (GO)	Rol
FTH1	Cadena pesada de ferritina	E en NP	Actividad secuestradora de iones de hierro.	SC.
HMGB1	Grupo de alta movilidad caja 1	SE en NP	Unión de lipopolisacárido; actividad de citoquinas; unión de ARN; actividad liasa; actividad quimioatrayente.	I.
HSPA4	Choque térmico Proteína 4 de 70 kDa	SE en NP	Actividad del factor de intercambio de adenil-nucleótido; unión de ATP; chaperona de plegamiento de proteínas dependiente de ATP.	SC.
PPIA	Peptidilprolil isomerasa A	SE en NP	Unión de integrinas; unión de ARN; unión a proteínas desplegadas.	SC.

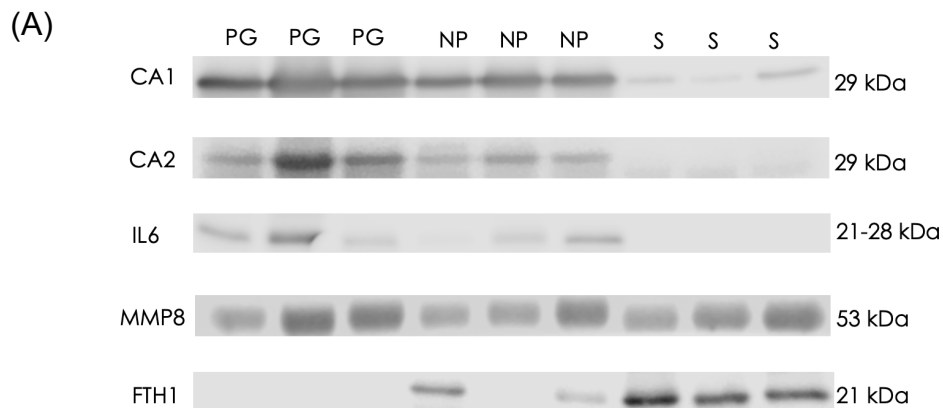
GLUD1	Glutamato deshidrogenasa 1	SE en NP	Actividad oxidorreductasa; Unión ADP; Unión de ATP; actividad glutamato deshidrogenasa (NAD+).	SC
-------	----------------------------	----------	--	----

GLUD2	Glutamato deshidrogenasa 2	SE en NP	Actividad oxidorreductasa; actividad glutamato deshidrogenasa (NAD+); unión a GTP.	SC
-------	----------------------------	----------	--	----

E: exclusiva; SE: sobreexpresado; I: inhibidor; P: promotor; SC: sin clasificar; M: marcador; NP: No progresión; PG: Progresión; * ≥ 2 fold change.

4.8 Western blot de proteínas biomarcadoras.

Los análisis semicuantitativos de las proteínas anhidrasa carbónica 2 (CA2) e interleucina 6 (IL6) revelaron una elevación significativa en el contenido de proteínas del grupo PG en comparación con el grupo S ($p=0,0114$ y $p=0,0458$, respectivamente). La proteína anhidrasa carbónica 1 (CA1) presentó un aumento significativo del grupo PG con respecto al grupo NP y S ($p=0,0023$ y $p<0,0001$, respectivamente). MMP-8 no presenta elevación significativa de proteínas entre los grupos de S, NP y PG; sin embargo, presenta un aumento de la cantidad de proteínas en el grupo PG, con un promedio (SE) de intensidad de banda de 587.1 versus NP con SE de 373.0 y S con 436.1 de SE. La cadena pesada de ferritina (FTH1) no se detectó durante la progresión de la periodontitis, pero presentó una elevación significativa en salud periodontal ($p=0,03$) (Figura 24 A, B).



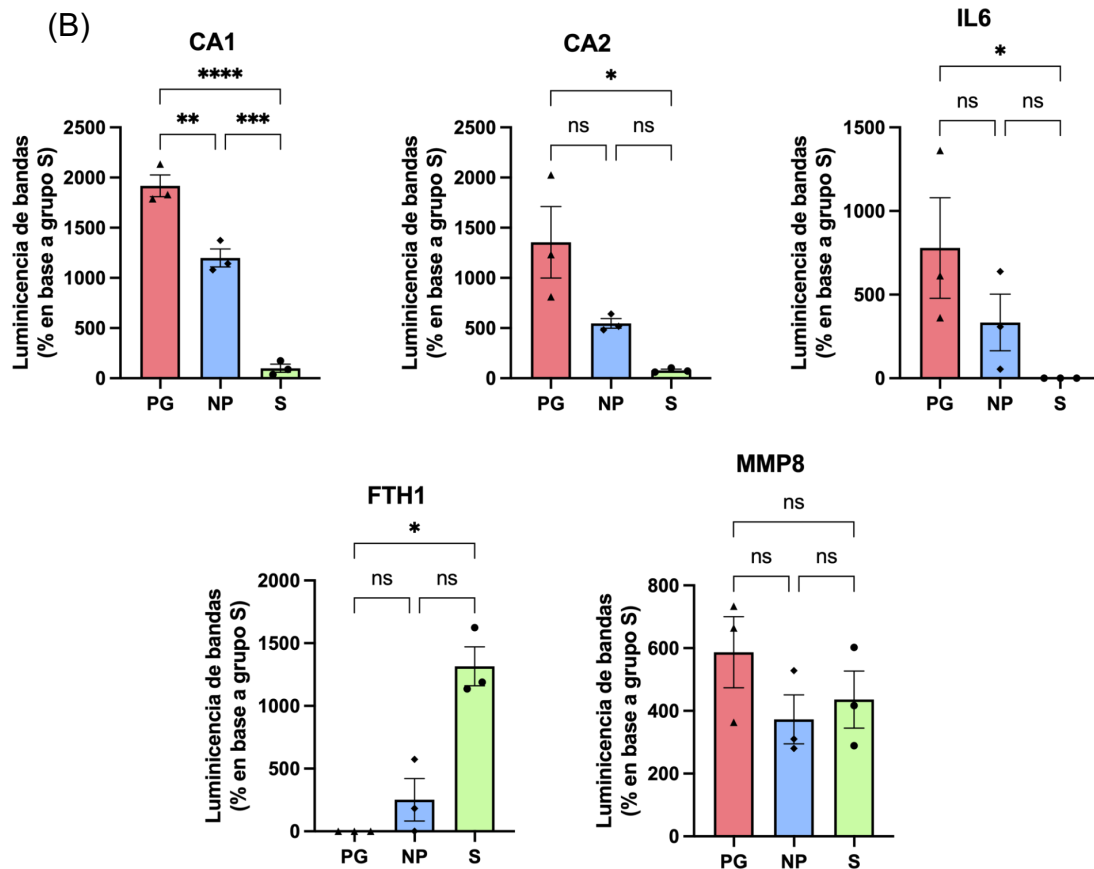


Figura 24. Análisis semicuantitativos de western blot. (A) Luminiscencia de bandas de las proteínas CA1, CA2, IL6, MMP8 y FTH1, en muestras de fluido gingival crevicular (FGC) separadas en grupo de progresión (PG), grupo de no progresión (NP), grupo y grupo sano (S). Los pesos moleculares (kDa) se muestran en el lado derecho de cada membrana. Las proteínas eluidas (40 μ l) se analizaron utilizando SDS-PAGE al 10 %. Las transferencias western se realizaron en réplicas (n=3). (B) Análisis semicuantitativo de la intensidad lumínica de bandas en ImageJ, normalizado en función del grupo sano (S). *: p<0.05, **: 0.01, ***: 0.001 y ns: no significativo.

4.9 Secuenciación de ARN unicelular para el análisis de susceptibilidad de células periodontales a las cinco MCR.

Para comprender la susceptibilidad de diferentes tipos de células periodontales a las distintas MCR (ferroptosis, apoptosis, piroptosis, netosis y necroptosis), se analizó el conjunto de datos scRNA-seq (GSE171213) de la base de datos GEO, que abarca un total de 21.045 células, incluidas 10.139 células de dos individuos del grupo correspondiente a controles sanos y 10.906 células de dos pacientes con

periodontitis (Figura 25A). Se empleó una reducción dimensional lineal para escalar los datos, para comprender el gran conjunto de datos. Se seleccionaron 15 componentes principales para el análisis de aproximación y proyección de colector uniforme (UMAP). El análisis UMAP identificó 21 agrupaciones imparciales de células. Se calcularon los genes marcadores y se anotó cada agrupación en función de estos, resultando en un total de once agrupaciones de diferentes tipos de células: células T CD4+, células T CD8+, células B, células plasmáticas, monocitos/macrófagos, fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, mastocitos y células endoteliales linfáticas (Figura 25a). Cabe destacar que se pudo observar que la proporción de células B plasmáticas es mayor en el grupo con periodontitis (PD1 y PD2) que en el grupo de control sano (H1 y H2) (Figura 25B).

Para explorar qué tipos de células periodontales son potencialmente responsables de influir en los cambios en el FGC durante la progresión de la periodontitis, se evaluó la expresión génica de proteínas seleccionadas y expresadas diferencialmente en la MCR tipo ferroptosis, apoptosis, piroptosis, netosis y necroptosis, de forma significativa en el proteoma FGC para cada MCR (Tabla 2). Las imágenes representativas se muestran en la Figura 25 C y E.

De los genes relacionados con apoptosis, se observó que la expresión génica de PRKAR1A fue difusa y el porcentaje de células que la expresan mayormente es baja, en excepción por las células de fibroblastos y endoteliales linfáticas que además presentaron un nivel de expresión entre 1 y 2. El porcentaje de células que expresan CASP6 es cercana a cero en todos los grupos, sin embargo, la agrupación de células endoteliales y células endoteliales linfáticas presentaron mayor expresión del gen (Figura 25 C y E).

De los genes relacionados con la ferroptosis, se observó que SNCA proteína exclusiva de PG del proteoma del FGC, presentó una expresión baja, predominante en las células endoteliales. FTH1 proteína exclusiva de NP, presentó participación importante independiente del grupo celular, mayor al 90% de células que la expresan, sin embargo, el grupo de células monocitos/macrófago presentaron mayor nivel de expresión, cercano al 2, seguido por células tipo mastocitos y

fibroblastos, cercanos al 1. GCLC y CDH1 presentaron una expresión baja, donde se destacó el grupo celular epitelial. Con una expresión difusa de ACO1 se destacó un mayor nivel de expresión del gen, menor al 0,8, del grupo celular de fibroblastos y células endoteliales. CBR1 presentó principalmente un mayor nivel de expresión de mayor o igual a 2 en el grupo de células epiteliales, le sigue con menor expresión la agrupación de fibroblastos y miofibroblastos, con niveles menores a 1. La expresión de CD44 es variada en los diferentes tipos celulares, el grupo celular de mastocitos presenta 80% de células que expresan el gen y un nivel de expresión alta, mayor a 2, le sigue con un 70% aproximadamente las células monocito/macrófagos y células T CD8+, pero con un menor nivel de expresión del gen, menor a 1. El porcentaje de células que expresan STMN1 es variada, con un 80% se destacan los grupos de células endoteliales linfáticas, mastocitos y epiteliales, con niveles de expresión entre el rango de 1 y 2. PRDX1 se expresó de forma difusa, el porcentaje de células que lo expresan es mayormente por las agrupaciones de células epiteliales, mastocitos y endoteliales linfáticas, presentando mayor expresión las células epiteliales, mayor a 2. HSPB1 presentó una expresión del 80% de la agrupación de células epiteliales con un nivel alto de expresión del gen, mayor a 2, seguido por las células endoteliales linfáticas. HMGB1 presentó una participación importante independiente de la agrupación celular, siendo mayor al 90% de células miofibroblastos y 75% de células epiteliales, que presentaron gran nivel de expresión entre el rango 1 y 2 (Figura 25 C y E).

De los genes relacionados con la piroptosis, se observó que la proteína ADORA2A exclusiva del grupo NP, se expresó en general de forma baja y no estuvo representada por un grupo en específico. La expresión de PKM fue difusa, presentó una mayor proporción de células que expresan el gen en la agrupación de fibroblastos y células epiteliales, con un nivel de expresión entre 1 y 2 (Figura 25 C y E).

De los genes relacionados con la necroptosis, se observó que la proteína HSPA4 presentó una expresión difusa, baja y no estuvo representada por un grupo en específico, el porcentaje de células que la expresaron fue menor al 10% en todos los grupos celulares, excepto en el grupo de fibroblastos con un 25% y que además

presenta mayor nivel de expresión, cercano al 1. El nivel de expresión de GLUD1 en las agrupaciones de células es variado, es menor al 25% en todos los grupos celulares exceptuando a la agrupación de fibroblastos cercano al 50% y con un nivel de expresión mayor a 2. GLUD2 no evidenció expresión en ningún tipo celular. PPIA presentó una participación importante independiente de la agrupación celular con un 75% de expresión, de un nivel mayor a 2 de las células epiteliales (Figura 25 C y E).

De los genes relacionados con la netosis, se observó la proteína PADI4 que no evidenció sobrerrepresentación en ningún grupo celular. SERPINB1 también manifestó un porcentaje de expresión mayormente baja, en excepción por las células de fibroblastos y endoteliales linfáticas, que presentan un nivel de expresión entre 1 y 2 (Figura 25 C y E).

DCN mostró una sobrerrepresentación en el grupo de células de fibroblastos, ya que el gen es expresado por el 90% de las células con un nivel de expresión mayor a 2. Por otra parte, ANXA5 presentó una expresión variada con sobrerrepresentación en el grupo de células de fibroblastos, es expresado por el 90% de las células con un nivel de expresión mayor a 2. También es expresado en un 75% por el grupo de células endoteliales linfáticas (Figura 25 C y E).

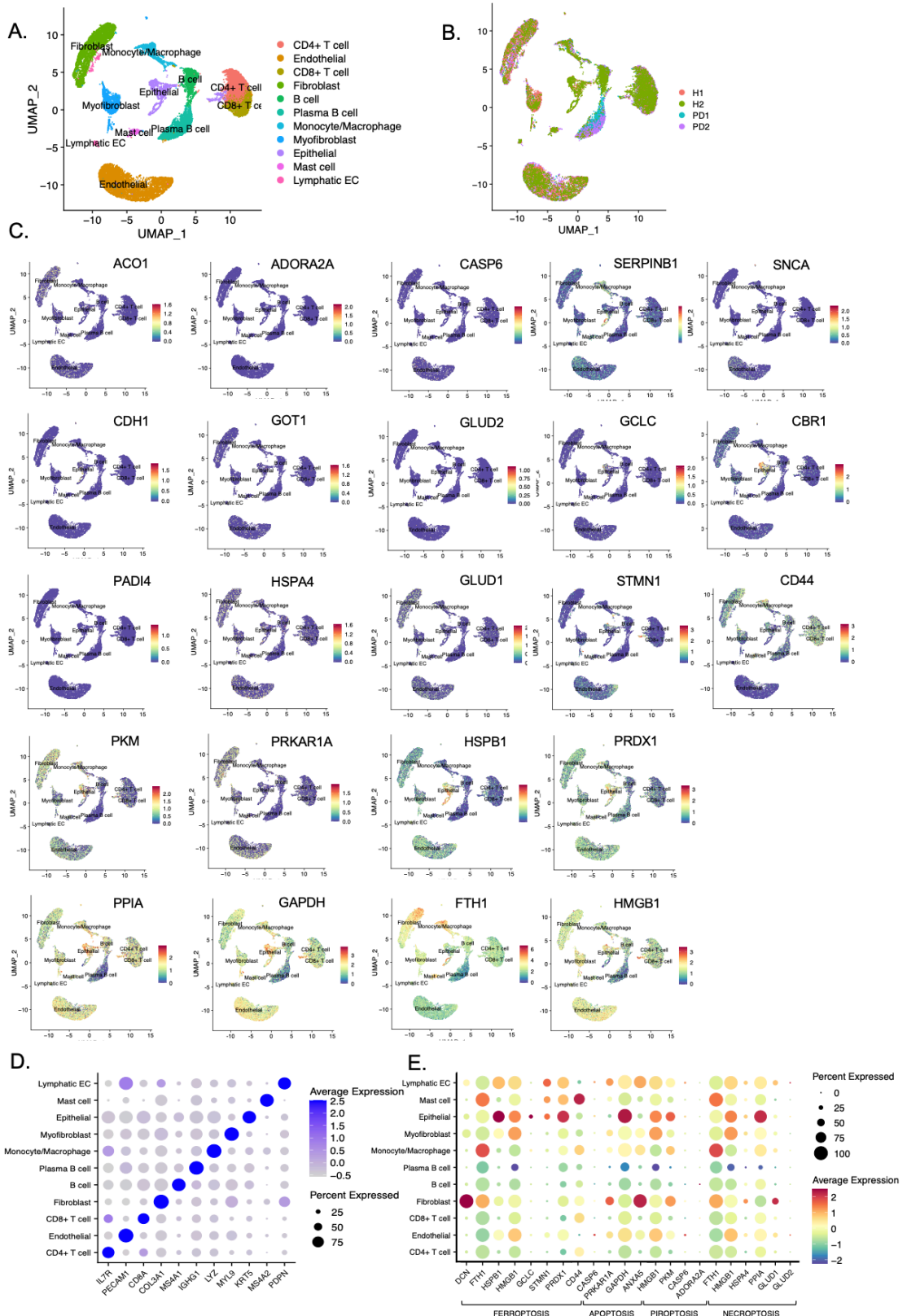


Figura 25. Proteínas seleccionadas en una secuenciación externa de ARN de una célula única (scRNA-seq) en tejido gingival marginal humano. A. Se identificaron once

grupos de células de tejido gingival marginal humano etiquetados y derivados de los datos agrupados del conjunto de scRNA-seq (GES164241). Estos grupos se visualizaron utilizando UMAP. B. Proyección UMAP integrada de grupos de células divididos por paciente, donde cada color representa un paciente diferente (H1, H2, PD1 y PD2). C. Diagrama de expresión génica de las once células para las proteínas seleccionadas y expresadas diferencialmente de las cinco MCR y de forma significativa en el proteoma FGC para cada MCR. El nivel de expresión promedio se representa utilizando una escala de gradiente de color. D. El gráfico de puntos ilustra los niveles de expresión de los marcadores seleccionados para la identificación de los once grupos de células. El nivel de expresión promedio se representa en una escala azul-gris, donde el gris significa el valor de expresión mínimo y el azul oscuro indica los niveles de expresión más altos. El tamaño de cada punto corresponde al porcentaje de células que expresan el gen. E. Gráfico de punto ilustra la expresión de genes de proteínas con diferencia estadísticamente significativas más sobrerrepresentadas de las MCR tipo ferroptosis, apoptosis, piroptosis y necroptosis, en los once grupos celulares. El nivel de expresión promedio se representa empleando una escala de gradiente de color. El tamaño de cada punto corresponde al porcentaje de células que expresan el gen.

5. DISCUSIÓN:

Este estudio analizó sistemáticamente el contenido proteico del FCG vinculado con cinco tipos de muerte celular regulada para dilucidar la importancia y rol de grupos específicos de proteínas de periodontitis, precisamente durante la progresión de la pérdida de la inserción clínica. Se identificaron genes asociados a ferroptosis, apoptosis, piroptosis, netosis y necroptosis mediante el análisis bioinformático del proteoma del FCG de pacientes con periodontitis en progresión (PG) y no progresión (NP).

Los genes expresados diferencialmente para la ferroptosis destacan la vía KEGG de rutas metabólicas, lo que permite inferir que los procesos y funciones celulares son diversas. También están relacionadas con la vía neurodegenerativa y de ferroptosis. En el análisis de enriquecimiento bioinformático podemos destacar nueve proteínas, con una diferencia significativa dentro del proteoma, cuyas funciones principales son de unión, actividad catalítica y oxidoreductasa (Figura 6), conforme al tipo de MCR. La proteína SNCA, exclusiva de PG y de baja abundancia relativa (Figura 2), tiene como principal función la actividad oxidoreductasa. Se describe como promotora de ferroptosis, y en estudios previos se ha demostrado que una reducción de su expresión en neuronas dopaminérgicas conduce a la evasión de ferroptosis, mientras que su elevación provoca una mayor vulnerabilidad a la peroxidación lipídica y a la ferroptosis (Angelova y cols., 2020; Mahoney-Sanchez y cols., 2022).

SNCA se relaciona de forma directa en la red IPP con HSPB1, proteína sobreexpresada en el grupo NP (Figura 2), que actúa como marcador e inhibidor de ferroptosis. Es una chaperona molecular que desempeña un rol en la resistencia al estrés y la organización de la actina. Se ha descrito que la regulación positiva de HSPB1 podría ser clave para la progresión y quimiorresistencia ya que influye en la regulación de la ferroptosis en cáncer de mama. También su sobreexpresión inhibe la ferroptosis inducida por erastina (Kostenko, S. y cols., 2009; Sun, X. y cols., 2015; Liang, Y. y cols., 2023). La proteína FTH1 media el almacenamiento de hierro y presenta un rol de marcador e inhibidor de la muerte celular. Estudios previos han descrito que FTH1 tiene un rol en la ferritinofagia, porque su sobreexpresión inhibió

la degradación de ferritina mediante ferroptosis, y también revelaron que mediante la vía NSUN5-FTH1/FTL se regula la ferroptosis (Treffry, A. y cols., 1997; Tian, Y. y cols., 2020; Liu, J. y cols., 2022). Esto es concordante con los resultados obtenidos, ya que en el proteoma del FGC se sobreexpresó de forma exclusiva en el grupo NP (Figura 2), y en análisis de inmunoblot no se detectó durante la progresión de la periodontitis, sin embargo, presentó una elevación en salud periodontal, con diferencia significativa con respecto al grupo PG (Figura 24 A, B).

Otras proteínas que presentan una diferencia significativa, que están sobreexpresadas en el grupo NP y se destacan en la red IPP son GCLC, PRDX1, CD44, CDH1, GOT1 y ACO1 (Figura 2 y 6). La proteína GCLC cataliza la reacción dependiente de ATP de L-glutamato y L-cisteína, y participa en el primer paso de la biosíntesis de glutatión (Misra, I., y Griffith, O., 1998). Presenta un rol de inhibidor de ferroptosis, ya que se han descrito como un potencial biomarcador de pronóstico de adenocarcinoma de pulmón, observándose que al silenciar el gen aceleró la ferroptosis, y también se indicó que tiene un papel protector contra la ferroptosis porque mantiene la homeostasis de glutamato (Kang, Y. y cols., 2021; Luo, L y cols., 2022). PRDX1 un nodo central de red IPP, es un regulador clave de la peroxidación lipídica, actúa como un inhibidor de la ferroptosis y se ha descrito que la pérdida de PRDX1 induce a un aumento significativo en la peroxidación lipídica (Lovatt, M., y cols., 2020; Fan, X., y cols., 2024). CD44 tiene el rol de inhibidor de ferroptosis, con funciones variadas que incluyen la activación, circulación y localización de linfocitos T, hematopoyesis, inflamación y respuesta a infecciones bacterianas (Funaro, A. y cols., 1994). Estudios observaron que la expresión de CD44 suprimió la ferroptosis (Liu, T. y cols., 2019; Bian, Z. y cols., 2023). CDH1 es una proteína de adhesión celular dependiente de calcio que presenta un rol inhibidor de ferroptosis. Se ha estudiado que regula negativamente la ferroptosis y se ha descrito una menor expresión en grupos de periodontitis que en pacientes sanos, sin embargo, se ha propuesto como posible estrategia terapéutica el silenciar CDH1 e impulsar la ferroptosis en células de cáncer de cabeza y cuello. (Lee, J. y cols., 2020; Shi, X. y cols., 2024). GOT1 tiene como función la biosíntesis de L-glutamato a partir de L-aspartato o L-cisteína (Shen, H. y cols., 2011) y actúa como inhibidor de ferroptosis, ya que se ha demostrado que al inhibir GOT1, promueve un estado catalítico,

mejora la disponibilidad de hierro lábil, potenciando la ferroptosis en células de cáncer pancreático (Kremer, D. y cols., 2021). ACO1 es un sensor de hierro bifuncional que, dependiendo de la concentración de hierro, se une a elementos sensibles al hierro o actúa como enzima que interconvierte el citrato y el isocitrato (Philpott, C. y cols., 1994), por lo que ejecuta un rol de promotor de ferroptosis. Además, incide en el silenciamiento de FTH1 para regular la homeostasis de hierro (Yao, F. y cols., 2021). Cabe destacar que ACO1 dentro del proteoma se encuentra sobreexpresado en el grupo de NP, pero es de baja abundancia relativa (Figura 23).

Al analizar las proteínas de apoptosis, el enriquecimiento bioinformático demostró una alta correlación de los genes, destacando la vía KEGG de apoptosis (Figura 7). Las funciones moleculares más significativas fueron de inhibición de proteína quinasa y actividad reguladora quinasa. Del conjunto expresado diferencialmente en apoptosis se destacó solo 2 proteínas con diferencia significativa, PRKAR1A y CASP6, sobrerrepresentadas en el grupo de NP (Figura 2 y 23). PRKAR1A es una subunidad de proteína quinasa dependiente de AMPc, que ante su regulación negativa genera una disminución de la apoptosis, resultando en una ganancia en proliferación y supervivencia celular (Robinson-White, A. y cols., 2006). En estudios *in vivo* el silenciamiento de PARKAR1A provocó la activación de la muerte celular (Gangoda, L. y cols., 2014). En cambio, CASP6 una proteasa de cisteína esencial en la muerte celular programa, deterioro axonal, desarrollo e inmunidad innata (Dagbay, K. y Hardy, J. 2017; MacPherson, D. y cols., 2019; Zheng, M. y cols., 2020), presenta un rol promotor de apoptosis, documentándose que al silenciar la proteína se inhibió a la apoptosis (Allsopp, T y cols., 2000; Cowling, V., y Downward, J., 2002). CASP6 también se clasificó con las herramientas bioinformáticas, dentro de la MCR tipo piroptosis, ya que recientemente se ha demostrado su participación en la activación del inflammasoma ZBP1-NLRP3 y también del inflammasoma CASP11-NLRP3 (Zheng, M. y cols., 2020; Zheng, M. y cols., 2021). Por lo tanto, CASP6 cumple un rol vital en la activación de muerte celular y en la defensa del huésped ante infecciones.

En cuanto a las proteínas relacionadas con piroptosis, el enriquecimiento de los datos destacó vías KEGG de infección bacteriana y también vías de MCR como

apoptosis, necroptosis y netosis. La proteína ADORA2A, exclusiva del grupo NP (Figura 2), se ha relacionado con proteínas de la vía de la apoptosis y se ha descrito en estudios bioinformáticos como gen diferencial de la piroptosis. Otras investigaciones han detallado su papel en la enfermedad de artritis reumatoidea y de la hemorragia cerebral al sobreexpresarse, además destaca su importancia para la secreción de IL-6, y que al inhibir la vía de señalización ADORA2A/MLCK inhibe la piroptosis neuronal (Bai, B. y cols., 2022; Hu, L. y cols., 2023; Tian, S. y cols., 2024). Por lo tanto, cumpliría un rol promotor de piroptosis. La proteína PKM, sobreexpresada en el grupo NP, contribuye al control de la glucólisis en su etapa final, conduciendo la producción de ATP (Dombrauckas, J. D. y cols., 2005). Se ha señalado como un gen clave implicado en la piroptosis en paciente con osteoporosis, y en estudios recientes han revelado que activa el inflamasoma NLRP3 promoviendo la muerte celular, por tanto, actúa como promotor de piroptosis (Liu, D. y cols., 2021; Li, Z. y cols., 2024).

El enriquecimiento bioinformático de las proteínas de netosis destacó la vía KEGG de activación plaquetaria y formación de trampas extracelulares de neutrófilos (Figura 15). También participan en procesos de respuesta al estrés y en funciones de actividad reguladora de la función molecular, unión enzimática, de señalización, como regulador enzimático y unión a proteínas citoesqueléticas, labor propia de la muerte celular por netosis. El gen codificante de proteínas SERPINB1 actúa como inhibidor de la serina proteasa de neutrófilos, es esencial en la regulación de la respuesta inmune innata, la inflamación y la homeostasis celular (Choi, Y. y cols., 2019). Se evidenció en un estudio *in vitro* e *in vivo*, que los neutrófilos con deficiencia de SERPINB1 son hipersensibles a la netosis (Farley, K. y cols., 2012), por lo que cumple con un rol inhibidor de la muerte celular (Tabla 2). Con respecto a HSPB1, se ha descrito mediante análisis bioinformáticos, que está involucrado en migración celular, organización citoesquelética, transporte y localización (Thimmappa, P. y cols., 2024) y se observó que la hiperfosforilación de HSPB1 inducida por homocisteína aumentaba la muerte celular por netosis (Thimmappa, P. y cols., 2022). La proteína PADI4, sobreexpresada en el grupo NP (Figura 2), es esencial para la muerte celular por netosis, ya que cataliza la hipercitrulización de histonas desencadenando la formación de trampas extracelular neutrófilos, por lo que cumple

un papel inherente en la respuesta inmune innata, capaces de neutralizar patógenos y también exacerbar la inflamación (Li, P., y cols., 2010; Liu, X. y cols., 2024), por lo tanto, actúa como promotor de muerte celular. GAPDH, sobreexpresado en el grupo NP, actúa como inhibidor de necrosis, siendo una enzima clave que cataliza el primer paso de la glicolisis, expresada de forma constitutiva en los tejidos (Tisdale E. J., 2002; Wong, S. y cols., 2005; Li, Y. y cols., 2023).

De las proteínas presentes en necroptosis FGC, el análisis de enriquecimiento bioinformático destacó la vía KEGG de necroptosis, presentando función molecular principal de unión. La proteína HSPA4 presentó sobreexpresión en el grupo de NP, ésta actúa principalmente por respuesta al estrés, y se ha descrito como gen relacionado con la necroptosis en estudios bioinformáticos (Zheng, J. y cols., 2022; Zheng, C. y cols., 2023). Se desconoce su rol en la muerte celular, ya que la literatura la ha detallado con funciones duales relacionadas con la polimerización de MLKL, esencial en la activación de muerte y, sin embargo, otros estudios en el cual se inhibió la HSPA4 se indujo necroptosis (Srinivasan, S. y cols., 2018; Johnston, A. y cols., 2020). PPIA es una citoquina quimiotáctica, distribuida ubicuamente, que cataliza la conversión entre los isómeros cis y trans de la prolina (Davis, T. y cols., 2010; Song, F. y cols., 2011). Se ha identificado en estudios bioinformáticos como marcador de necroptosis y en estudios *in vivo* se observó que se sobreexpresaba en el tejido con carcinoma hepatocelular y que al suprimir regular negativamente el crecimiento celular (Cheng, S. y cols., 2016; Peng, Y. y cols., 2023; Wang, G. y cols., 2023), por lo tanto, presenta potencialmente rol de inhibidor de la muerte celular de necroptosis. GLUD1 es una enzima mitocondrial que cataliza la conversión de glutamato a alfa-cetoglutarato (Vandenabeele, P. y cols., 2010), que se sobreexpresó en el grupo de NP (Figura 2). Se ha observado que al disminuir la necroptosis, se redujo la actividad de GLUD1, de igual forma al ser silenciada se atenuó la necroptosis inducida por TNF, al contrario, al activar la necroptosis dependiendo de RIP3, también se impulsó la activación de GLUD1 (Ryan, F. y cols., 2018; Han, Q. y cols., 2018; Xue, C. y cols., 2020), por lo que se puede considerar como promotor de muerte celular. En cuanto a la proteína GLUD2, fundamental en el reciclaje de glutamato durante la neurotransmisión, se ha propuesto como gen diferencial de la muerte por necroptosis presentes en pacientes con cáncer de colon.

Se desconoce su rol dentro de esta vía, sin embargo, supone un rol promotor ya que se ha documentado que al sobreexpresar inhibe el crecimiento de células del glioblastoma y también exacerba la muerte de neuronas dopaminérgicas, reduciendo la expresión y función de transportadores de glutamato en la enfermedad de Parkinson (Franceschi, S. y cols., 2018; Zhang, W. y cols., 2020; Wang, Y. y cols., 2022). FTH1 también se presentó como marcador de necroptosis, de hecho, en un estudio se observó su presencia en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello como gen pronóstico y factor dañino manifestado en pacientes con necroptosis activa y en progresión del cáncer (Zhang, Z. y cols., 2022).

El grupo de alta movilidad caja 1 (HMGB1) está sobreexpresada en el grupo NP de la periodontitis. Es una proteína pleiotrópica, ubicua y representativo DAMP, media la respuesta inflamatoria e inmunitaria (Lotze, M. y cols., 2005; Kang, R. y cols., 2014). Está presente en el FGC en los conjuntos de muerte celular tipo ferroptosis, netosis, necroptosis y piroptosis. La literatura indica que la autofagia regula la secreción de HMGB1 y promueve su acetilación durante la ferroptosis, también los activadores de ferroptosis inducen la liberación de HMGB1 y, así mismo, esta proteína regula muerte celular a través de la vía Nrf2, y concordante con otros hallazgos, indican que actúa como inductor de la ferroptosis en astrocitos, agravando el daño agudo en cerebros postisquémicos (Wen, Q. y cols., 2019; Wu, Y. y cols., 2021; Davaanyam, D. y cols., 2023). También actúa en la patogénesis de la insuficiencia hepática, expandiendo a la respuesta inflamatoria al activar la vía de piroptosis dependiente de caspasa 1, sin embargo, se ha hallado que la liberación de HMGB1 se induce por la lisis celular inducida por piroptosis, por lo que cumpliría un rol de marcador de lisis celular (Volchuk, A. y cols., 2020; Hou, W. y cols., 2021). En otros estudios en que se bloqueó HMGB1, impidió la formación de NET, en cambio el suministro de esta proteína impulsó la formación de NET (Zhan, Y., y cols., 2022). Por lo que cumple con un rol promotor de la muerte celular de ferroptosis, piroptosis y netosis. Sin embargo, en la necroptosis actúa como regulador, ya que se ha descrito que en células de leucemia mieloide aguda, HMGB1 extracelular ejerce un rol represor de necroptosis (Liu, Y., y cols., 2019), y

por otro lado se ha descrito que al inhibir HMBG1 se ha suprimido la necroptosis en hepatocitos (Wen, S., y cols., 2020).

Para complementar los resultados bioinformáticos y determinar la participación de las proteínas durante la progresión de la periodontitis se analizó la presencia de las proteínas con electrotransferencia. Se detectó IL-6 y MMP-8 (Figura 24) como marcadores de periodontitis ampliamente estudiados (Tymkiw, K. D. y cols., 2011; Hernández, M. y cols., 2010; Zhu, L., y cols., 2019; Hernández, M. y cols., 2020; Mazurek-Mochol, M. y cols., 2024). Se detectó la proteína total de MMP-8 tanto en S, NP y PG, existiendo una mayor expresión durante la progresión de la enfermedad. Sin embargo, al comparar entre salud y no progresión, a pesar de que en NP presenta inflamación gingival, pero sin destrucción clínica, no se pudo discriminar una diferencia de concentración total de la MMP-8. Se requiere de otras condiciones para poder detectar una diferenciación de su forma activada que presenta menor peso molecular, lo cual se puede obtener con western blot en condiciones no reductoras (Hernández, M. y cols., 2010). Los niveles de IL-6 durante la progresión de la enfermedad presentó diferencia significativa respecto al estado de salud periodontal, lo cual es concordante con la literatura ya que se ha descrito ampliamente como marcador proinflamatorio de la periodontitis (Mazurek-Mochol, M. y cols., 2024; Cardoso, E. y cols., 2018).

Las proteínas CA1 y CA2 también presentaron una diferencia significativa durante la progresión (PG), en comparación con el grupo de NP y S. Estas proteínas son enzimas que catalizan la reacción reversible de síntesis de ácido carbónico (H_2CO_3) a partir de CO_2 y H_2O (Li, Z., y cols., 2020). En la literatura se ha descrito la participación de CA2 en eventos capaces de destruir las estructuras periodontales, incluyendo el hueso alveolar, el cemento y el ligamento periodontal (Salvi, G. y cols., 1998). En muestras de fibroblastos del ligamento periodontal de pacientes sanos y con periodontitis expuestos a *Porphyromonas gingivalis* se pesquisó un aumento de los niveles de CA2, (Sokos, D. y cols., 2014). Como CA2 es componente esencial que interviene en el metabolismo del osteoclasto, facilitando la acidificación del medio y la descomposición de los minerales óseos, se ha descrito que su disfunción genera que los osteoclastos no ejerzan su función de

reabsorción ósea y por consiguiente, que aumenten la densidad y masa del esqueleto (Aguilar, F. y cols., 2009). En este contexto, CA1 se ha propuesto como biomarcador candidato presente en el FGC de pacientes con periodontitis crónica (Baliban, R. y cols., 2012), ya que esta proteína también promueve la formación de carbonato de calcio (CaCO_3), precipitación de sales de calcio importante en la formación ósea, por lo que su sobreexpresión puede agravar la inflamación articular y la destrucción tisular (Zheng, Y. y cols., 2012). Además, las anhidrasas carbónicas se asocian en la modulación de la ferroptosis a través de la vía de señalización RAS-MAPK, debido a que la inhibición de las anhidrasas carbónicas desencadena una acidosis intracelular activando la vía y en consecuencia generando una sobrecarga de hierro induciendo la MCR (Li, Z., y cols., 2020). Cabe señalar que las proteínas identificadas en esta investigación no pudieron ser analizadas con inmunoblot debido a la falta de muestras y errores técnicos producidos durante la electroforesis y la detección de bandas.

Luego, para comprender la susceptibilidad de las células en los procesos de muerte celular durante la progresión de la periodontitis, se integró los datos proteómicos con el análisis scRNA-seq, donde reveló que células participaban mayormente: fibroblastos, epiteliales, monocito/macrófagos y endoteliales linfáticas (Figura 25).

Los fibroblastos son fundamentales para el mantenimiento de los tejidos periodontales y su óptima cicatrización, ya que son las principales células en producir matriz extracelular y sintetizan colágeno tipo I y III (Chang, Y. C. y cols., 2001). Para una mayor comprensión de la susceptibilidad de las células de fibroblastos durante la periodontitis y de muerte celular tipo apoptosis, se analizó la expresión génica adicionales a los genes de MCR, los cuales fueron decorina (DCN) y anexina 5 (ANXA5) (Aljagthmi, W. y cols., 2024; Vermes, I. y cols., 1995; Koopman, G. y cols., 1994). Los fibroblastos ante una respuesta inflamatoria, al presentar inflamación neutrofílica en el FGC, actúan y producen citocinas que recubren las células epiteliales, generando alarmas para las células inflamatorias (Bains, V. y Bains, R., 2015). El análisis de scARNseq reveló la participación de los fibroblastos en varios tipos de muerte celular ya que expresan proteínas de

ferroptosis (CBR1 y ACO1), proteínas de necroptosis (HSPA4 y GLUD1), proteína de piroptosis (PKM) y proteína de apoptosis (PRKAR1A).

Otras células implicadas son las células epiteliales, estas expresaron las proteínas PRDX1, CBR1, HSPB1, CDH1 y GCLC que forman parte de las proteínas de muerte celular tipo ferroptosis, la proteína PPIA de necroptosis y las proteínas HSPB1, GAPDH y SERPINB1 de netosis. La principal célula en secretar FTH1 fue la de monocitos/macrófagos, pero que también participó en la expresión de CD44 y SERPINB1, genes pertenecientes a ferroptosis y netosis, respectivamente. Las células endoteliales linfáticas expresaron principalmente proteínas de apoptosis (PRKAR1A, CASP6 y ANXA5), y la proteína de ferroptosis (STMN1). Los mastocitos tienen en común con los monocitos/macrófagos, la expresión de FTH1, CD44 y STMN1, proteínas de ferroptosis, por lo que este tipo de muerte celular está mayormente expresado en células de inmunidad innata.

Por lo tanto, durante la periodontitis se presentan las cinco muertes celulares reguladas en las células del tejido gingival marginal, ya que actúan de forma simultánea y no independientes. En este contexto, se ha descrito estrecha regulación cruzada entre apoptosis, necroptosis y piroptosis, un estudio analizó la caspasa 8 (CASP8), como nexo entre las tres muertes. En ausencia de CASP8 se forma el complejo RIPK1/RIPK3, denominado ripoptosoma, que luego recluta y fosforila MLKL, formando el necrosoma. Por el contrario, la presencia de CASP8 previene el necrosoma, disminuyendo la necroptosis y favoreciendo la apoptosis. La apoptosis permite la liberación de moléculas de señalización proinflamatorias como IL-1b y IL-18, estas maduran por medio de caspasa 1 activada (CASP1) que también permite el procesamiento de GSDMD que genera la formación de poros en la membrana y posterior lisis celular, propio de la muerte celular por piroptosis, y libera DAMP como HMGB1, que como se mencionó anteriormente promueve piroptosis, netosis y ferroptosis, e inhibe a la necroptosis. Cabe destacar que CASP8 también contribuye en la maduración de CASP1 e IL-1, e incide en GSDMD promoviendo la activación de NLRP3 (Bertheloot, D. y cols., 2021).

En el análisis scRNA-seq no se observó el grupo celular de neutrófilos (Figura 25), por lo que se infirió debido a su naturaleza celular, que se desestimó su presencia

en el tejido gingival marginal, ya que estarían mayormente presentes en el FGC (Bains, V., y Bains, R., 2015). El neutrófilo, es el leucocito más abundante y principal célula inflamatoria que actúa ante un estímulo dañino (Margraf, A. y cols., 2022). Los neutrófilos viven por más tiempo en los tejidos orales con periodontitis crónica (Hajishengallis G., 2020), también secretan IL-1b y promueven la formación de NET en aneurisma aórtico abdominales experimentales (Meher, A. y cols., 2018). Además, IL-1b influye de forma parcial en la progresión de la periodontitis ya que induce la ferroptosis al promover ROS y reducir el nivel de glutatión peroxidasa 4 (GPX4), un regulador negativo de ferroptosis (Basit, F. y cols., 2017; Zhang, C. y cols., 2023). Cabe señalar que las células epiteliales y monocitos/macrófagos presentaron mayor expresión de proteínas de netosis, lo que resalta la interacción de neutrófilos y monocitos/macrófagos. Los macrófagos inciden al activarse y secretar quimioatrayentes de neutrófilos como IL-1a, CXCL1, CXCL2 y el ligando de quimiocina motivo CC (CCL2), y también aumenta la vida media de los neutrófilos al secretar el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y TNF α (Prame Kumar, K. y cols., 2018). Luego los PMN ubicados en el sitio de inflamación, amplifican la respuesta inflamatoria reclutando monocitos, también estimula su diferenciación a macrófago, e incluso su polarización a un fenotipo M1 o M2 (Herrero-Cervera, A., y cols., 2022). Por lo tanto, la inmunidad innata a cargo de las células mastocitos y monocito/macrófagos está mayormente presente en la periodontitis y partícipes mayoritariamente en la muerte celular regulada tipo ferroptosis.

Otro factor que considerar son las abundancias relativas presentes en el proteoma, que reflejan el rango dinámico de la actividad celular durante procesos celulares como el ciclo celular o ante la respuesta al estrés (Figura 23). Es importante mencionar que sólo basándonos en el nivel de expresión de ARNm produce un análisis insuficiente, ya que la regulación de la expresión génica y la abundancia de proteínas se coordinan para garantizar el equilibrio de los procesos (Mehdi, A. y cols., 2014). Por ello la relevancia de integrar los datos de transcriptómica y proteómica. Estudios hallaron que la variabilidad de la abundancia de proteínas al comparar líneas de células cancerosas y de tejidos sanos, las proteínas de alta

conservación evolutiva tienden a una mayor abundancia y menor variabilidad en su expresión, por lo tanto, emplean roles esenciales y estables en las células. Por el contrario, aquellas de menor abundancias presentan mayor variabilidad, cumplen funciones más específicas y adaptativas (Schaefer, M. y cols., 2014; Yadav, D. y cols., 2022). En consecuencia, las proteínas expresadas de forma exclusiva como SNCA del grupo PG y FTH1 del grupo NP, son principales y potenciales biomarcadores de muerte celular por ferroptosis. La proteína ADORA2A también es un potencial biomarcador de piroptosis, sin embargo, se requiere un mayor estudio ya que se desconoce la incidencia en las vías de la muerte celular, pero presentaría papel promotor de la piroptosis. Por último, la proteína ACO1 presenta una abundancia relativa baja y su papel es de promotor de la ferrotosis, por lo que también sería un potencial marcador de progresión de periodontitis o como marcador pronóstico de periodontitis.

6. CONCLUSIONES

- 1) Este estudio proporciona una visión detallada de las proteínas asociadas a los procesos de ferroptosis, piroptosis, necroptosis y netosis presentes en el FGC de sitios periodontales en progresión y no progresión. Se revelan diversas funciones e interacciones de estas proteínas asociadas con distintos tipos de MCR, lo cual pueden orientar el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas para la periodontitis.
- 2) La ferroptosis se destaca como un proceso relevante en la progresión de la periodontitis, no así las otras muertes celulares debido a que no se conoce claramente la interacciones de cada una de las muertes en el tejido periodontal. Por lo tanto, se requiere más investigación para explorar el potencial de estos hallazgos.
- 3) Se propone realizar investigaciones adicionales *in vitro*, como el uso de western blot nuevamente, para detectar las proteínas identificadas en esta investigación que no pudieron ser analizadas debido a la falta de muestras y dificultades técnicas. También se sugiere el uso de estudios *in vivo* que permitirán dilucidar aún más el rol de las proteínas y entender su papel en la progresión de la periodontitis. Aunque esta investigación identificó a la proteína SNCA como participante en la progresión de la enfermedad, y su implicancia en la ferroptosis está documentada, queda por conocer su participación en tejidos periodontales, para determinar de forma concisa su papel en la progresión.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Aguilar, F. C., Perea, A. Á., Antúnez, M. G., González-Cobos, C. L., Llorente, B. P., y cols. (2009). Osteopetrosis del adulto. Conceptos actuales. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 18(4), 90-92. [https://doi.org/10.1016/s1132-8460\(09\)73464-6](https://doi.org/10.1016/s1132-8460(09)73464-6)

Aljagthmi, W. A., Alasmari, M. A., Daghestani, M. H., Al-Kharashi, L. A., Al-Mohanna, F. H., y cols. (2024). Decorin (DCN) Downregulation Activates Breast Stromal Fibroblasts and Promotes Their Pro-Carcinogenic Effects through the IL-6/STAT3/AUF1 Signaling. *Cells*, 13(8), 680. <https://doi.org/10.3390/cells13080680>

Allsopp, T. E., McLuckie, J., Kerr, L. E., Macleod, M., Sharkey, J., y cols. (2000). Caspase 6 activity initiates caspase 3 activation in cerebellar granule cell apoptosis. *Cell death and differentiation*, 7(10), 984–993. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400733>

Angelova, P. R., Choi, M. L., Berezhnov, A. V., Horrocks, M. H., Hughes, C. D., De, S., y cols. (2020). Alpha synuclein aggregation drives ferroptosis: an interplay of iron, calcium and lipid peroxidation. *Cell death and differentiation*, 27(10), 2781–2796. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0542-z>

Aristizábal B, González Á. Innate Immune System. In: Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, Editors. (2013). Capítulo 2. En *Autoimmunity: From Bench to Bedside* (pp. 31–43). El Rosario University Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459455/>

Arthur Liberzon, Aravind Subramanian, Reid Pinchback, Helga Thorvaldsdóttir, Pablo Tamayo, y cols. Base de datos de firmas moleculares (MSigDB) 3.0, *Bioinformática*, volumen 27, número 12, junio de 2011, páginas 1739–1740, <https://doi.org/10.1093/bioinformática/btr260>

Bai, B., Liu, Y., Abudukerimu, A., Tian, T., Liang, M., y cols. (2022). Key Genes Associated with Pyroptosis in Gout and Construction of a miRNA-mRNA Regulatory Network. *Cells*, 11(20), 3269. <https://doi.org/10.3390/cells11203269>

Bains, V. K., & Bains, R. (2015). The antioxidant master glutathione and periodontal health. *Dental research journal*, 12(5), 389–405. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.166169>

- Baliban, R. C., Sakellari, D., Li, Z., DiMaggio, P. A., Garcia, B. A., y cols. (2012). Novel protein identification methods for biomarker discovery via a proteomic analysis of periodontally healthy and diseased gingival crevicular fluid samples. *Journal of clinical periodontology*, 39(3), 203–212. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01805.x>
- Barbieri Petrelli, G., Flores Guillén, J., & Vignoletti, F.. (2005). El neutrófilo y su importancia en la enfermedad periodontal. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 17(1), 11-16. Recuperado en 23 de diciembre de 2021, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852005000100002&lng=es&tlng=es
- Basit, F., van Oppen, L. M., Schöckel, L., Bossenbroek, H. M., van Emst-de Vries, S. E., y cols. (2017). Mitochondrial complex I inhibition triggers a mitophagy-dependent ROS increase leading to necroptosis and ferroptosis in melanoma cells. *Cell death & disease*, 8(3), e2716. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.133>
- Barros, S. P., Williams, R., Offenbacher, S., & Morelli, T. (2016). Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontology 2000*, 70(1), 53–64. <https://doi.org/10.1111/prd.12107> (Barros, S. 2016).
- Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular & molecular immunology*, 18(5), 1106–1121. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
- Bian, Z., Sun, X., Liu, L., Qin, Y., Zhang, Q., y cols. (2023). Sodium Butyrate Induces CRC Cell Ferroptosis via the CD44/SLC7A11 Pathway and Exhibits a Synergistic Therapeutic Effect with Erastin. *Cancers*, 15(2), 423. <https://doi.org/10.3390/cancers15020423>
- Bostanci, N., Bao, K., Greenwood, D., Silbereisen, A., & Belibasakis, G. N. (2019). Periodontal disease: From the lenses of light microscopy to the specs of proteomics and next-generation sequencing. *Advances in clinical chemistry*, 93, 263–290. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.07.006>
- Botero J. E. (2009). Immune response in the periodontium: from health to disease and therapeutic implications. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfoua/v21n1/v21n1a12.pdf>

- Cardoso, E. M., Reis, C., & Manzanares-Céspedes, M. C. (2018). Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases. *Postgraduate medicine*, *130*(1), 98–104. <https://doi.org/10.1080/00325481.2018.1396876> (Cardoso, E. y cols. 2018).
- Carranza, C. J., Ruiz, A. K., González, C., & Cruz, S.L. (2020). Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. *Residente*, *15*(3), 97-112. <https://doi.org/10.35366/95960>
- Cebesoy, E. I., Altaca, M., Kocak-Oztug, N. A., Bingül, I., & Cifcibasi, E. (2024). Associations between interleukin-10, -12, and -18 and periodontal health and disease: a cross-sectional study. *Clinical oral investigations*, *28*(8), 458. <https://doi.org/10.1007/s00784-024-05843-8>
- Chang, Y. C., Lii, C. K., Tai, K. W., & Chou, M. Y. (2001). Adverse effects of arecoline and nicotine on human periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Journal of clinical periodontology*, *28*(3), 277–282. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2001.028003277.x>
- Chen, Y., Jin, X., Wang, Q., Hu, S., & Huang, X. (2024). Causal role of immune cells in chronic periodontitis: a bidirectional Mendelian randomization study. *BMC oral health*, *24*(1), 806. <https://doi.org/10.1186/s12903-024-04592-0>
- Chen, X., Comish, P. B., Tang, D., & Kang, R. (2021). Characteristics and Biomarkers of Ferroptosis. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 637162. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.637162>
- Cheng, S., Luo, M., Ding, C., Peng, C., Lv, Z., y cols. (2016). Downregulation of Peptidylprolyl isomerase A promotes cell death and enhances doxorubicin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Gene*, *591*(1), 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.07.020>
- Choi, Y. J., Kim, S., Choi, Y., Nielsen, T. B., Yan, J., y cols. (2019). SERPINB1-mediated checkpoint of inflammatory caspase activation. *Nature immunology*, *20*(3), 276–287. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0303-z>
- Cowling, V., & Downward, J. (2002). Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal

of caspase-6 prodomain. *Cell death and differentiation*, 9(10), 1046–1056. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401065>

da Silva, M., de Carvalho, A., Alves, E., da Silva, F., Pessoa, L., y cols., (2017). Genetic Factors and the Risk of Periodontitis Development: Findings from a Systematic Review Composed of 13 Studies of Meta-Analysis with 71,531 Participants. *International journal of dentistry*, 2017, 1914073. <https://doi.org/10.1155/2017/1914073>

Davaanyam, D., Lee, H., Seol, S. I., Oh, S. A., Kim, S. W., y cols. (2023). HMGB1 induces hepcidin upregulation in astrocytes and causes an acute iron surge and subsequent ferroptosis in the postischemic brain. *Experimental & molecular medicine*, 55(11), 2402–2416. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01111-z>

Dagbay, K. B., & Hardy, J. A. (2017). Multiple proteolytic events in caspase-6 self-activation impact conformations of discrete structural regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(38), E7977–E7986. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704640114>

D'Arcy M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>

Davis, T. L., Walker, J. R., Campagna-Slater, V., Finerty, P. J., Paramanathan, R., y cols. (2010). Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLoS biology*, 8(7), e1000439. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000439>

Dombrauckas, J. D., Santarsiero, B. D., & Mesecar, A. D. (2005). Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis. *Biochemistry*, 44(27), 9417–9429. <https://doi.org/10.1021/bi0474923>

Fan, X., Liu, F., Wang, X., Wang, Y., Chen, Y., y cols. (2024). LncFASA promotes cancer ferroptosis via modulating PRDX1 phase separation. *Science China. Life sciences*, 67(3), 488–503. <https://doi.org/10.1007/s11427-023-2425-2>

Farley, K., Stolley, J. M., Zhao, P., Cooley, J., & Remold-O'Donnell, E. (2012). A serpinB1 regulatory mechanism is essential for restricting neutrophil extracellular

trap generation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(9), 4574–4581. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201167>

Fielden, M. R., Matthews, J. B., Fertuck, K. C., Halgren, R. G., & Zacharewski, T. R. (2002). In silico approaches to mechanistic and predictive toxicology: an introduction to bioinformatics for toxicologists. *Critical reviews in toxicology*, 32(2), 67–112. <https://doi.org/10.1080/20024091064183>

Fontaine, J. F., Priller, F., Barbosa-Silva, A., & Andrade-Navarro, M. A. (2011). Génie: literature-based gene prioritization at multi genomic scale. *Nucleic acids research*, 39(Web Server issue), W455–W461. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr246>

Franceschi, S., Corsinovi, D., Lessi, F., Tantillo, E., Aretini, P., y cols. (2018). Mitochondrial enzyme GLUD2 plays a critical role in glioblastoma progression. *EBioMedicine*, 37, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.10.008>

Funaro, A., Spagnoli, G. C., Momo, M., Knapp, W., & Malavasi, F. (1994). Stimulation of T cells via CD44 requires leukocyte-function-associated antigen interactions and interleukin-2 production. *Human immunology*, 40(4), 267–278. [https://doi.org/10.1016/0198-8859\(94\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0198-8859(94)90026-4)

Gangoda, L., Doerflinger, M., Srivastava, R., Narayan, N., Edgington, L. E., y cols. (2014). Loss of Prkar1a leads to Bcl-2 family protein induction and cachexia in mice. *Cell death and differentiation*, 21(11), 1815–1824. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.98>

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., y cols. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

Garth R. Brown, Vichet Hem, Kenneth S. Katz, Michael Ovetsky, Craig Wallin, y cols. Gene: una información centrada en los genes recurso en NCBI, *Nucleic Acids Research* , volumen 43, número D1, 28 de enero de 2015, páginas D36–D42, <https://doi.org/10.1093/nar/gku1055>

- Ge, S. X., Jung, D., & Yao, R. (2020). ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 36(8), 2628–2629. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>
- Goodson, J. M., Tanner, A. C., Haffajee, A. D., Sornberger, G. C., & Socransky, S. S. (1982). Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*, 9(6), 472–481. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1982.tb02108.x>
- Green, D. R., Oguin, T. H., & Martinez, J. (2016). The clearance of dying cells: table for two. *Cell death and differentiation*, 23(6), 915–926. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.172>
- Hajishengallis G. (2020). New developments in neutrophil biology and periodontitis. *Periodontology 2000*, 82(1), 78–92. <https://doi.org/10.1111/prd.12313>
- Han, Q., Ma, Y., Wang, H., Dai, Y., Chen, C., y cols. (2018). Resibufogenin suppresses colorectal cancer growth and metastasis through RIP3-mediated necroptosis. *Journal of translational medicine*, 16(1), 201. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1580-x>
- Harry, J. Breen, Newell W. Johnson, Pauline A. Rogers. (1999). Site-Specific Attachment Level Change Detected by Physical Probing in Untreated Chronic Adult Periodontitis: *Review of Studies 1982-1997. 13-06-2021, de Journal of Periodontology Volume 70*, Sitio web: <https://doi.org/10.1902/jop.1999.70.3.312>
- Hernández, M., Gamonal, J., Tervahartiala, T., Mäntylä, P., Rivera, O., y cols. (2010). Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. *Journal of periodontology*, 81(11), 1644–1652. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.100196>
- Mazurek-Mochol, M., Bonsmann, T., Mochol, M., Poniewierska-Baran, A., & Pawlik, A. (2024). The Role of Interleukin 6 in Periodontitis and Its Complications. *International journal of molecular sciences*, 25(4), 2146. <https://doi.org/10.3390/ijms25042146>

Hernández, M., Baeza, M., Contreras, J., Sorsa, T., Tervahartiala, T., y cols. (2020). MMP-8, TRAP-5, and OPG Levels in GCF Diagnostic Potential to Discriminate between Healthy Patients', Mild and Severe Periodontitis Sites. *Biomolecules*, 10(11), 1500. <https://doi.org/10.3390/biom10111500>

Herrero-Cervera, A., Soehnlein, O., & Kenne, E. (2022). Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cellular & molecular immunology*, 19(2), 177–191. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00832-3>

Hernández Pedroso, Wilfredo, Rittoles Navarro, Aliusha, González López, Armando, Joanes Fiol, Javier, & Amador Armenteros, Armando. (2000). Catabolismo proteico en el paciente politraumatizado. *Revista Cubana de*

Medicina Militar, 29(3), 157-161. Recuperado en 18 de junio de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572000000300001&lng=es&tlng=es

Hoogendijk, A. J., Pourfarzad, F., Aarts, C. E. M., Tool, A. T. J., Hiemstra, I. H., y cols. (2019). Dynamic Transcriptome-Proteome Correlation Networks Reveal Human Myeloid Differentiation and Neutrophil-Specific Programming. *Cell reports*, 29(8), 2505–2519.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.082>

Hou, W., Wei, X., Liang, J., Fang, P., Ma, C., y cols. (2021). HMGB1-Induced Hepatocyte Pyroptosis Expanding Inflammatory Responses Contributes to the Pathogenesis of Acute-on-Chronic Liver Failure (ACLF). *Journal of inflammation research*, 14, 7295–7313. <https://doi.org/10.2147/JIR.S336626>

Hu, L., Ruan, C., Ke, Q., & Li, M. (2023). Ferroptosis, Pyroptosis and Necroptosis-related Genes in Sepsis-induced Acute Respiratory Distress Syndrome and Immune Infiltration. *Research Square (Research Square)*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3298554/v1>

Huynh, A. H., Veith, P. D., McGregor, N. R., Adams, G. G., Chen, D., y cols. (2015). Gingival crevicular fluid proteomes in health, gingivitis and chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*, 50(5), 637–649. <https://doi.org/10.1111/jre.12244>

- Janakiram, C., & Dye, B. A. (2020). A public health approach for prevention of periodontal disease. *Periodontology* 2000, 84(1), 202–214. <https://doi.org/10.1111/prd.12337>
- Johnston, A. N., Ma, Y., Liu, H., Liu, S., Hanna-Addams, S., y cols. (2020). Necroptosis-blocking compound NBC1 targets heat shock protein 70 to inhibit MLKL polymerization and necroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(12), 6521–6530. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916503117>
- Jounai, N., Kobiyama, K., Takeshita, F., & Ishii, K. J. (2013). Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 168. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00168>
- Kang, R., Chen, R., Zhang, Q., Hou, W., Wu, S., y cols. (2014). HMGB1 in health and disease. *Molecular aspects of medicine*, 40, 1–116. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2014.05.001>
- Kang, Y. P., Mockabee-Macias, A., Jiang, C., Falzone, A., Prieto-Farigua, N. y cols. (2021). Non-canonical Glutamate-Cysteine Ligase Activity Protects against Ferroptosis. *Cell metabolism*, 33(1), 174–189.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.12.007>
- Khurshid, Z., Zohaib, S., Najeeb, S., Zafar, M. S., Rehman, R., y cols. (2016). Advances of Proteomic Sciences in Dentistry. *International journal of molecular sciences*, 17(5), 728. <https://doi.org/10.3390/ijms17050728>
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., y cols. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84(5), 1415–1420.
- Kostenko, S., Johannessen, M., & Moens, U. (2009). PKA-induced F-actin rearrangement requires phosphorylation of Hsp27 by the MAPKAP kinase MK5. *Cellular signalling*, 21(5), 712–718. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.01.009>
- Kremer, D. M., Nelson, B. S., Lin, L., Yarosz, E. L., Halbrook, C. J., y cols. (2021). GOT1 inhibition promotes pancreatic cancer cell death by ferroptosis. *Nature communications*, 12(1), 4860. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24859-2>

Lamont, R. J., & Hajishengallis, G. (2015). Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends in molecular medicine*, 21(3), 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.004>

Lamster I. B. (1997). Evaluation of components of gingival crevicular fluid as diagnostic tests. *Annals of periodontology*, 2(1), 123–137. <https://doi.org/10.1902/annals.1997.2.1.123>

Lanyon, E. 2021. Caracterización proteómica de fluido gingival crevicular de sitios con sacos periodontales antes y durante la progresión clínica de la periodontitis [Tesis de maestría no publicada]. Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Lee, J., You, J. H., Kim, M. S., & Roh, J. L. (2020). Epigenetic reprogramming of epithelial-mesenchymal transition promotes ferroptosis of head and neck cancer. *Redox biology*, 37, 101697. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101697>

Liang, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Ye, F., Luo, D., y cols. (2023). HSPB1 facilitates chemoresistance through inhibiting ferroptotic cancer cell death and regulating NF- κ B signaling pathway in breast cancer. *Cell death & disease*, 14(7), 434. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05972-0>

Li, P., Li, M., Lindberg, M. R., Kennett, M. J., Xiong, N., y cols. (2010). PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *The Journal of experimental medicine*, 207(9), 1853–1862. <https://doi.org/10.1084/jem.20100239>

Li, Y., Hook, J. S., Ding, Q., Xiao, X., Chung, S. S., y cols. (2023). Neutrophil metabolomics in severe COVID-19 reveal GAPDH as a suppressor of neutrophil extracellular trap formation. *Nature communications*, 14(1), 2610. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37567-w>

Li, Z., Jiang, L., & Toyokuni, S. (2020). Role of carbonic anhydrases in ferroptosis-resistance. *Archives of biochemistry and biophysics*, 689, 108440. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108440>

Li, Z., Wang, B., Wang, R., Zhang, Z., Xiong, J., y cols. (2024). Identification of PKM2 as a pyroptosis-related key gene aggravates senile osteoporosis via the

NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 169, 106537. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2024.106537>

Liu, D., Xiao, Y., Zhou, B., Gao, S., Li, L., y cols. (2021). PKM2-dependent glycolysis promotes skeletal muscle cell pyroptosis by activating the NLRP3 inflammasome in dermatomyositis/polymyositis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 60(5), 2177–2189. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keaa473>

Liu, J., Ren, Z., Yang, L., Zhu, L., Li, Y., y cols. (2022). The NSUN5-FTH1/FTL pathway mediates ferroptosis in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell death discovery*, 8(1), 99. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00902-z>

Liu, T., Jiang, L., Tavana, O., & Gu, W. (2019). The Deubiquitylase OTUB1 Mediates Ferroptosis via Stabilization of SLC7A11. *Cancer research*, 79(8), 1913–1924. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3037>

Liu, X., Arfman, T., Wichapong, K., Reutelingsperger, C. P. M., Voorberg, J., y cols. (2021). PAD4 takes charge during neutrophil activation: Impact of PAD4 mediated NET formation on immune-mediated disease. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 19(7), 1607–1617. <https://doi.org/10.1111/jth.15313>

Liu, Y., Chen, P., Xu, L., Ouyang, M., Wang, D., y cols. (2019). Extracellular HMGB1 prevents necroptosis in acute myeloid leukemia cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 112, 108714. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108714>

Lotze, M. T., & Tracey, K. J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nature reviews. Immunology*, 5(4), 331–342. <https://doi.org/10.1038/nri1594>

Lovatt, M., Adnan, K., Kocaba, V., Dirisamer, M., Peh, G. S. L., y cols. (2020). Peroxiredoxin-1 regulates lipid peroxidation in corneal endothelial cells. *Redox biology*, 30, 101417. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101417>

Luo, L., Zhang, Z., Weng, Y., & Zeng, J. (2022). Ferroptosis-Related Gene GCLC Is a Novel Prognostic Molecular and Correlates with Immune Infiltrates in Lung Adenocarcinoma. *Cells*, 11(21), 3371. <https://doi.org/10.3390/cells11213371>

MacPherson, D. J., Mills, C. L., Ondrechen, M. J., & Hardy, J. A. (2019). Tri-arginine exosite patch of caspase-6 recruits substrates for hydrolysis. *The Journal of biological chemistry*, *294*(1), 71–88. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005914>

Mahoney-Sanchez, L., Bouchaoui, H., Boussaad, I., Jonneaux, A., Timmerman, K., y cols. (2022). Alpha synuclein determines ferroptosis sensitivity in dopaminergic neurons via modulation of ether-phospholipid membrane composition. *Cell reports*, *40*(8), 111231. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111231>

Maniyammai, A. S., Renukadevi, R., Esther Nalini, H., Prasad, A. K., & Amudha, M. (2021). Adaptive immune response: Molecular aspects of periodontal disease. *International Journal of Applied Dental Sciences*, *7*(4), 89-92. <https://doi.org/10.22271/oral.2021.v7.i4b.1356>

Margraf, A., Lowell, C. A., & Zarbock, A. (2022). Neutrophils in acute inflammation: current concepts and translational implications. *Blood*, *139*(14), 2130–2144. <https://doi.org/10.1182/blood.2021012295>

Mehdi, A. M., Patrick, R., Bailey, T. L., & Bodén, M. (2014). Predicting the dynamics of protein abundance. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, *13*(5), 1330–1340. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.033076>

Meher, A. K., Spinoso, M., Davis, J. P., Pope, N., Laubach, V. E., y cols. (2018). Novel Role of IL (Interleukin)-1 β in Neutrophil Extracellular Trap Formation and Abdominal Aortic Aneurysms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *38*(4), 843–853. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309897>

Ministerio de Salud. (2017, marzo). Enfermedad periodontal: descripción y epidemiología del problema de salud. diprece.minsal. Recuperado 28 de agosto de 2024, de <https://diprece.minsal.cl/temas-de-salud/orden-alfabetico/guias-clinicas-no-ges/guias-clinicas-no-ges-salud-bucal/salud-oral-en-adolescentes-de-10-19-anos-prevencion-diagnostico-y-tratamiento-de-la-enfermedad-periodontal/#:~:text=La%20enfermedad%20periodontal%20est%C3%A1%20presente,da%C3%B1o%20acumulativo%20en%20el%20tiempo>.

Misra, I., & Griffith, O. W. (1998). Expression and purification of human gamma-glutamylcysteine synthetase. *Protein expression and purification*, *13*(2), 268–276. <https://doi.org/10.1006/prev.1998.0897>

Zhou, N., Yuan, X., Du, Q., Zhang, Z., Shi, X., y cols. (2023). FerrDb V2: update of the manually curated database of ferroptosis regulators and ferroptosis-disease associations. *Nucleic acids research*, 51(D1), D571–D582. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac935>

Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., y cols (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*, 89 Suppl 1, S173–S182. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>

Peng, Y. L., Wang, L. X., Li, M. Y., Liu, L. P., & Li, R. S. (2023). Construction and validation of a prognostic signature based on necroptosis-related genes in hepatocellular carcinoma. *PloS one*, 18(2), e0279744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279744>

Pérez Zapata, L. J., Trejos Ramírez, A. M., Arias Sierra, A. A., & López Quintero, J. Álvaro. (2020). Formación de trampas extracelulares de neutrófilos humanos in vitro: descripción de un método. *Hechos Microbiológicos*, 10(1-2). <https://doi.org/10.17533/udea.hm.v10n1a01>

Philpott, C. C., Klausner, R. D., & Rouault, T. A. (1994). The bifunctional iron-responsive element binding protein/cytosolic aconitase: the role of active-site residues in ligand binding and regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(15), 7321–7325. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.15.7321>

Prame Kumar, K., Nicholls, A. J., & Wong, C. H. Y. (2018). Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell and tissue research*, 371(3), 551–565. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2753-2>

Robinson-White, A. J., Leitner, W. W., Aleem, E., Kaldis, P., Bossis, I., y cols. (2006). PRKAR1A inactivation leads to increased proliferation and decreased apoptosis in human B lymphocytes. *Cancer research*, 66(21), 10603–10612. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2200>

Ryan, F., Khodagholi, F., Dargahi, L., Minai-Tehrani, D., & Ahmadiani, A. (2018). Temporal Pattern and Crosstalk of Necroptosis Markers with Autophagy and

Apoptosis Associated Proteins in Ischemic Hippocampus. *Neurotoxicity research*, 34(1), 79–92. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9861-3>

Salvi, G. E., Beck, J. D., & Offenbacher, S. (1998). PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Annals of periodontology*, 3(1), 40–50. <https://doi.org/10.1902/annals.1998.3.1.40>

Santhosh, V. C., Karishma, Khader, A. A., Ramachandra, V., Singh, R., Shetty, B. K., & Nimbalkar, V. K. (2023). Effect of periostin in peri-implant sulcular fluid and gingival crevicular fluid: A comparative study. *Annals of African medicine*, 22(4), 465–469. https://doi.org/10.4103/aam.aam_171_22

Schaefer, M. H., Yang, J. S., Serrano, L., & Kiel, C. (2014). Protein conservation and variation suggest mechanisms of cell type-specific modulation of signaling pathways. *PLoS computational biology*, 10(6), e1003659. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003659>

Shen, H., Damcott, C., Shuldiner, S. R., Chai, S., Yang, R., y cols. (2011). Genome-wide association study identifies genetic variants in GOT1 determining serum aspartate aminotransferase levels. *Journal of human genetics*, 56(11), 801–805. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.105>

Shi, X., Liu, J., Lu, Z., Li, J., Zhang, S., y cols. (2024). Role of ferroptosis in *Porphyromonas gingivalis*-induced impairment of epithelial junction. *Journal of oral microbiology*, 16(1), 2334578. <https://doi.org/10.1080/20002297.2024.2334578>

Singh, R., Letai, A., y Sarosiek, K. (2019) Regulación de la apoptosis en la salud y la enfermedad: el acto de equilibrio de las proteínas de la familia BCL-2. *Reseñas de naturaleza. Biología celular molecular*, 20(3), 175-193. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>

Slots, J. (2017), Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontol 2000*, 75: 7-23. <https://doi.org/10.1111/prd.12221>

Sokos, D., Scheres, N., Schoenmaker, T., Everts, V., & de Vries, T. J. (2014). A challenge with *Porphyromonas gingivalis* differentially affects the osteoclastogenesis potential of periodontal ligament fibroblasts from periodontitis

patients and non-periodontitis donors. *Journal of clinical periodontology*, 41(2), 95–103. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12186>

Song, F., Zhang, X., Ren, X. B., Zhu, P., Xu, J., y cols. (2011). Cyclophilin A (CyPA) induces chemotaxis independent of its peptidylprolyl cis-trans isomerase activity: direct binding between CyPA and the ectodomain of CD147. *The Journal of biological chemistry*, 286(10), 8197–8203. <https://doi.org/10.1074/jbc.C110.181347>

Sorsa, T., Gursoy, U. K., Nwhator, S., Hernandez, M., Tervahartiala, T., y cols. (2016). Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 70(1), 142–163. <https://doi.org/10.1111/prd.12101>

Srinivasan, S. R., Cesa, L. C., Li, X., Julien, O., Zhuang, M., y cols. (2018). Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Suppresses RIP1-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cascades. *Molecular cancer research : MCR*, 16(1), 58–68. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0408>

Sun, X., Ou, Z., Xie, M., Kang, R., Fan, Y., y cols. (2015). HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death. *Oncogene*, 34(45), 5617–5625. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.32>

Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., y cols. (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic acids research*, 45(D1), D362–D368. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw937>

Teles, R., Benecha, H. K., Preisser, J. S., Moss, K., Starr, J. R., y cols. (2016). Modelling changes in clinical attachment loss to classify periodontal disease progression. *Journal of clinical periodontology*, 43(5), 426–434. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12539>

Thimmappa, P. Y., Nair, A. S., Najjar, M. A., Mohanty, V., Shastry, S., y cols. (2022). Quantitative phosphoproteomics reveals diverse stimuli activate distinct signaling pathways during neutrophil activation. *Cell and tissue research*, 389(2), 241–257. <https://doi.org/10.1007/s00441-022-03636-7>

- Thimmappa, P. Y., Nair, A. S., D'silva, S., Aravind, A., Mallya, S., y cols. (2024). Neutrophils display distinct post-translational modifications in response to varied pathological stimuli. *International immunopharmacology*, *132*, 111950. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.111950>
- Tian, S., Zheng, H., Wu, W., & Wu, L. (2024). Predicting Diagnostic Biomarkers Associated with Pyroptosis in Neuropathic Pain Based on Machine Learning and Experimental Validation. *Journal of inflammation research*, *17*, 1121–1145. <https://doi.org/10.2147/JIR.S445382>
- Tian, Y., Lu, J., Hao, X., Li, H., Zhang, G., y cols. (2020). FTH1 Inhibits Ferroptosis Through Ferritinophagy in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *17*(4), 1796–1812. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00929-z>
- Tisdale E. J. (2002). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase Ciota λ and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway. *The Journal of biological chemistry*, *277*(5), 3334–3341. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109744200>
- Torres, A., Michea, M. A., Végvári, Á., Arce, M., Morales, A., y cols. (2023). Proteomic profile of human gingival crevicular fluid reveals specific biological and molecular processes during clinical progression of periodontitis. *Journal of periodontal research*, *58*(5), 1061–1081. <https://doi.org/10.1111/jre.13169>
- Treffry, A., Zhao, Z., Quail, M. A., Guest, J. R., & Harrison, P. M. (1997). Dinuclear center of ferritin: studies of iron binding and oxidation show differences in the two iron sites. *Biochemistry*, *36*(2), 432–441. <https://doi.org/10.1021/bi961830I>
- Trindade, F., Oppenheim, F. G., Helmerhorst, E. J., Amado, F., Gomes, P. S., y cols. (2014). Uncovering the molecular networks in periodontitis. *Proteomics. Clinical applications*, *8*(9-10), 748–761. <https://doi.org/10.1002/prca.201400028>
- Tymkiw, K. D., Thunell, D. H., Johnson, G. K., Joly, S., Burnell, K. K., y cols. (2011). Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, *38*(3), 219–228. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01684.x>

- UniProt Consortium T. (2018). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research*, 46(5), 2699. <https://doi.org/10.1093/nar/gky092>
- Valerio Jr., L. G. (2014). In silico methods. *Encyclopedia of Toxicology*, Third Edition, 1026–1029. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01057-5>
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(10), 700–714. <https://doi.org/10.1038/nrm2970>
- Vela, M. E. F. V., & Gutiérrez-Aguilar, R. (2017, 12 octubre). Ciencias “ómicas”, ¿cómo ayudan a las ciencias de la salud? <https://www.revista.unam.mx/ojs/index.php/rdu/article/view/1166>
- Velázquez, J., Garibay, O. (2017). Análisis in silico: Modelado de Proteínas. *Tlamati*, 8. <http://tlamati.uagro.mx/t82e/49.pdf>
- Vitkov, L., Minnich, B., Knopf, J., Schauer, C., Hannig, M., y cols. (2020). NETs Are Double-Edged Swords with the Potential to Aggravate or Resolve Periodontal Inflammation. *Cells*, 9(12), 2614. <https://doi.org/10.3390/cells9122614>
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods*, 184(1), 39–51. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-i](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-i)
- Volchuk, A., Ye, A., Chi, L., Steinberg, B. E., & Goldenberg, N. M. (2020). Indirect regulation of HMGB1 release by gasdermin D. *Nature communications*, 11(1), 4561. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18443-3>
- Wang, G., Liu, X., Liu, H., Zhang, X., Shao, Y., y cols. (2023). A novel necroptosis related gene signature and regulatory network for overall survival prediction in lung adenocarcinoma. *Scientific reports*, 13(1), 15345. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41998-2>
- Wang, Y., Huang, Y., Li, C., Wang, X., Yang, M., y cols. (2022). Establishment of a Necroptosis Related Genes Signature to Predict Prognosis and Therapeutic Response in Colon Cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 921320. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.921320>

- Wen, Q., Liu, J., Kang, R., Zhou, B., & Tang, D. (2019). The release and activity of HMGB1 in ferroptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 510(2), 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.090>
- Wen, S., Li, X., Ling, Y., Chen, S., Deng, Q., y cols. (2020). HMGB1-associated necroptosis and Kupffer cells M1 polarization underlies remote liver injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(3), 4384–4402. <https://doi.org/10.1096/fj.201900817R>
- Williams, D. W., Greenwell-Wild, T., Brenchley, L., Dutzan, N., Overmiller, A., y cols. (2021). Human oral mucosa cell atlas reveals a stromal-neutrophil axis regulating tissue immunity. *Cell*, 184(15), 4090–4104.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.013>
- Wong, S. C., Chan, J. K., Lee, K. C., Lo, E. S., & Tsang, D. N. (2005). Development of a quantitative assay for SARS coronavirus and correlation of GAPDH mRNA with SARS coronavirus in clinical specimens. *Journal of clinical pathology*, 58(3), 276–280. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.016592>
- Wu, Y., Zhao, Y., Yang, H. Z., Wang, Y. J., & Chen, Y. (2021). HMGB1 regulates ferroptosis through Nrf2 pathway in mesangial cells in response to high glucose. *Bioscience reports*, 41(2), BSR20202924. <https://doi.org/10.1042/BSR20202924>
- Xia, S., Hollingsworth, L. R., 4th, & Wu, H. (2020). Mechanism and Regulation of Gasdermin-Mediated Cell Death. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 12(3), a036400. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036400>
- Xue, C., Gu, X., Li, G., Bao, Z., & Li, L. (2020). Mitochondrial Mechanisms of Necroptosis in Liver Diseases. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 66. <https://doi.org/10.3390/ijms22010066>
- Yadav, D., Thakur, B., Kumar, D., Chowdhary, S., Bhattacharyya, R., y cols. (2022). Sorting of exclusive mitochondrial proteins from the Mitoproteome database. *Bulletin Of The National Research Centre/Bulletin Of The National Research Center*, 46(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00952-4>

- Yao, F., Cui, X., Zhang, Y., Bei, Z., Wang, H., y cols. (2021). Iron regulatory protein 1 promotes ferroptosis by sustaining cellular iron homeostasis in melanoma. *Oncology letters*, 22(3), 657. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12918>
- Zhang, C., Xue, P., Ke, J., & Cai, Q. (2023). Development of Ferroptosis-Associated ceRNA Network in Periodontitis. *International dental journal*, 73(2), 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.identj.2022.05.004>
- Zhang, W., Gong, J., Ding, L., Zhang, Z., Pan, X., y cols. (2020). Functional validation of a human GLUD2 variant in a murine model of Parkinson's disease. *Cell death & disease*, 11(10), 897. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03043-2>
- Zhan, Y., Ling, Y., Deng, Q., Qiu, Y., Shen, J., y cols. (2022). HMGB1-Mediated Neutrophil Extracellular Trap Formation Exacerbates Intestinal Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Lung Injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 208(4), 968–978. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100593>
- Zhang, Z., Hu, X., Qiu, D., Sun, Y., & Lei, L. (2022). Development and Validation of a Necroptosis-Related Prognostic Model in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of oncology*, 2022, 8402568. <https://doi.org/10.1155/2022/8402568>
- Zheng, C., Guo, H., Mo, Y., & Liu, G. (2023). Integrating Bioinformatics and Drug Sensitivity Analyses to Identify Molecular Characteristics Associated with Targeting Necroptosis in Breast Cancer and their Clinical Prognostic Significance. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 10.2174/1574892819666230831112815. Advance online publication. <https://doi.org/10.2174/1574892819666230831112815>
- Zheng, J., Cai, X., Zhang, Y., Wang, H., Liu, L., y cols. (2022). A comprehensive pan-cancer analysis of necroptosis molecules in four gynecologic cancers. *BMC cancer*, 22(1), 1160. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-10166-6>
- Zheng, M., Karki, R., Vogel, P., & Kanneganti, T. D. (2020). Caspase-6 Is a Key Regulator of Innate Immunity, Inflammasome Activation, and Host Defense. *Cell*, 181(3), 674–687.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.040>
- Zheng, M., Karki, R., Kancharana, B., Berns, H., Pruetz-Miller, S. M., y cols. (2021). Caspase-6 promotes activation of the caspase-11-NLRP3 inflammasome during

gram-negative bacterial infections. *The Journal of biological chemistry*, 297(6), 101379. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101379>

Zheng, Y., Wang, L., Zhang, W., Xu, H., & Chang, X. (2012). Transgenic mice over-expressing carbonic anhydrase I showed aggravated joint inflammation and tissue destruction. *BMC musculoskeletal disorders*, 13, 256. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-13-256>

Zhu, L., Yao, Y., Liu, J., Wang, J., & Xie, H. (2019). Expression of β -catenin and MMP-8 in gingival crevicular fluid and gingival tissue indicates the disease severity of patients with chronic periodontitis. *Experimental and therapeutic medicine*, 18(3), 2131–2139. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7794>

8. ANEXOS Y APÉNDICES

Anexo 1. Identificación de proteínas de interés dada la combinación del proteoma del FGC con minería de datos, de las cinco MCR.

Ferrotosis FGC.					
[PP] and [Proteoma FGC] and [Ferroptosis]:	Abundance Ratio: (Progressive) / (Non-progressive)	Fold change 2	GRUPO	Abundance Ratio Adj. P-Value: (Progressive) / (Non progressive)	0,05
FTH1	0,01	-100	NP	3,2054E-16	Significativo
LRRFIP1	0,36	- 2,8166023	NP	#DIV/0!	#DIV/0!
NDRG1	0,37	- 2,6977778	NP	0,41401526	No Significativo
HSPB1	0,42	- 2,3975225	NP	0,00104691	Significativo
PTPN6	0,42	- 2,3755144	NP	0,35258718	No Significativo
HMGB1	0,46	- 2,1630559	NP	0,03852802	Significativo
CTSB	0,49	- 2,0274185	NP	0,0967106	No Significativo
GCLC	0,59	- 1,6820128	NP	0,00631809	Significativo

FABP4	0,6	-1,675252	NP	0,22013054	No Significativo
STMN1	0,61	- 1,6450584	NP	0,02065632	Significativo
PRDX1	0,63	- 1,5889629	NP	0,00826666	Significativo
ALOX15	0,64	- 1,5522388	NP	0,39864056	No Significativo
CD44	0,65	- 1,5357479	NP	0,00085582	Significativo
YWHAE	0,72	- 1,3909324	NP	0,41193536	No Significativo
TXN	0,83	- 1,2079117	NP	0,05531595	No Significativo
HRAS	0,83	-1,199211	NP	0,71552532	No Significativo
KRAS	0,83	-1,199211	NP	0,71552532	No Significativo
NRAS	0,83	-1,199211	NP	0,71552532	No Significativo
LAMP2	0,84	- 1,1906158	NP	0,49210824	No Significativo

TMSB4X	0,87	-1,153929	NP	0,88868477	No Significativo
PARK7	0,87	-1,1494949	NP	0,89112724	No Significativo
MAPK14	0,87	-1,1470292	NP	0,94177758	No Significativo
LCN2	0,87	-1,1441281	NP	0,49902262	No Significativo
CDH1	0,88	-1,1395122	NP	0,0338929	Significativo
EIF2S1	0,88	-1,137931	NP	0,73756913	No Significativo
CIRBP	0,89	-1,1230448	NP	0,91935107	No Significativo
FH	0,9	-1,1158594	NP	0,51886537	No Significativo
QSOX1	0,91	-1,1034156	NP	0,53459969	No Significativo
NCF2	0,91	-1,0972222	NP	0,10094132	No Significativo

VCP	0,93	-	NP	0,81549189	No Significativo
		1,0736515			
CFL1	0,97	-	NP	0,2574166	No Significativo
		1,0342801			
UBC	0,98	-	NP	0,78239278	No Significativo
		1,0222025			
HSPA5	1		PG	0,20584459	No Significativo
G6PD	1,03		PG	0,93550769	No Significativo
PEBP1	1,07		PG	0,41623605	No Significativo
CYBB	1,09		PG	0,7312882	No Significativo
TXNRD1	1,12		PG	0,73032652	No Significativo
CAPG	1,18		PG	0,3266021	No Significativo
PRDX6	1,22		PG	0,12229386	No Significativo

IDH2	1,29		PG	0,52996531	No Significativo
GPX4	3,14		PG	0,16564257	No Significativo
SNCA	100		PG	3,2054E-16	Significativo

[Proteoma FGC] and [Ferroptosis]:	Abundance Ratio: (Progressive) / (Non-progressive)	Fold change 2	GRUPO	Abundance Ratio Adj. P-Value: (Progressive) / (Non progressive)	0,05
OTUB1	1,63980263		PG	0,34017924	No Significativo
CHP1	1,52025783		PG	0,05536316	No Significativo
ACSL1	1,30784708		PG	0,64743171	No Significativo
CCDC6	1,24333494		PG	0,52535339	No Significativo
CP	1,19264069		PG	0,16857978	No Significativo

AHCY	1,19186047		PG	0,15295038	No Significativo
TF	0,98647242	- 1,0137131	NP	0,76964548	No Significativo
DLD	0,87087912	-1,148265	NP	0,57753993	No Significativo
ECH1	0,83513097	-1,197417	NP	0,28155752	No Significativo
PGD	0,79919137	- 1,2512648	NP	0,3573934	No Significativo
IDH1	0,77852349	- 1,2844828	NP	0,13265391	No Significativo
P4HB	0,77145086	- 1,2962588	NP	0,06644828	No Significativo
COPZ1	0,73726115	- 1,3563715	NP	0,78080558	No Significativo
GSTM1	0,72228089	- 1,3845029	NP	0,4632661	No Significativo
CS	0,70445695	- 1,4195332	NP	0,26248146	No Significativo

SNX5	0,6994302	- 1,4297352	NP	0,17576579	No Significativo
GOT1	0,5502542	- 1,8173419	NP	0,00974635	Significativo
ACO1	0,54279601	- 1,8423127	NP	0,01699283	Significativo
ENO3	0,53975364	- 1,8526971	NP	0,19019576	No Significativo
CBR1	0,50241546	- 1,9903846	NP	0,032551	Significativo
ALDH3A2	0,48151333	- 2,0767857	NP	0,06606046	No Significativo

Apoptosis FGC					
[PP] and [Proteoma FGC] and [Apoptosis]:	Abundance Ratio: (Progressive) / (Non-progressive)	Fold change 2	GRUPO	Abundance Ratio Adj. P-Value: (Progressive) / (Non progressive)	0,05
CASP6	0,71	-1,41	NP	0,02070455	Significativo
CYCS	0,76	-1,32	NP	0,54291625	No Significativo

CASP3	0,93	-1,08	NP	0,3230591	No Significativo
CAPN1	0,97	-1,03	NP	0,77271328	No Significativo
PRKAR1A	0,51	-1,95	NP	0,00640103	Significativo

[Proteoma FGC] and [Apoptosis] :	Abundance Ratio: (Progressive) / (Non-progressive)	Fold change 2	GRUPO	Abundance Ratio Adj. P-Value: (Progressive) / (Non progressive)	0,05
CHP1	1,52	-0,658	PG	0,05536316	No Significativo
IL1RAP	0,826	-1,211	NP	0,51832395	No Significativo
PRKAR2A	0,766	-1,306	NP	0,11416001	No Significativo

Piroptosis FGC

[PP] and [Proteoma FGC] and [Piroptosis]:	Abundance Ratio: (Progressive) / (Non-progressive)	Fold change 2	GRUPO	Abundance Ratio Adj. P-Value: (Progressive) / (Non progressive)	0,05
ADORA2A	0,01	-100	NP	3,2054E-16	Significativo
HMGB1	0,46	-2,16	NP	0,03852802	Significativo
AGER	0,48	-2,1	NP	0,05694411	No Significativo
PKM	0,6	-1,66	NP	0,00495083	Significativo
PAK2	0,64	-1,56	NP	0,06576618	No Significativo
ANXA1	0,64	-1,56	NP	0,0841115	No Significativo
CASP6	0,71	-1,41	NP	0,02070456	Significativo
IL36G	0,72	-1,39	NP	0,4138035	No Significativo
DHX9	0,74	-1,36	NP	0,14863305	No Significativo

CYCS	0,76	-1,32	NP	0,54291625	No Significativo
VIM	0,83	-1,21	NP	0,22865286	No Significativo
MAPK14	0,87	-1,15	NP	0,94177758	No Significativo
CASP3	0,93	-1,08	NP	0,3230591	No Significativo
ELANE	0,93	-1,08	NP	0,76605346	No Significativo
PYCARD	0,93	-1,07	NP	0,21345232	No Significativo
CAMP	0,95	-1,05	NP	0,7160399	No Significativo
CAPN1	0,97	-1,03	NP	0,77271328	No Significativo
CASP1	1,09	-0,91	PG	0,48883222	No Significativo

[Proteoma FGC] and [Piroptosis] :	Abundance Ratio: (Progressive) / (Non-progressive)	Fold change 2	GRUPO	Abundance Ratio Adj. P-Value: (Progressive) / (Non progressive)	0,05
APOE	1,02535211		PG	0,32290041	No Significativo
GBP2	1,02047556		PG	0,41333889	No Significativo
VTN	0,97655546	- 1,0240074	NP	0,6037655	No Significativo
TUBB6	0,71729587	- 1,3941248	NP	0,25532507	No Significativo
CRTAC1	0,69083333	- 1,4475271	NP	0,47927811	No Significativo

Netosis FGC					
[PP] and [Proteoma FGC] and [Netosis]:	Abundance Ratio: (Progressive) / (Non-progressive)	Fold change 2	GRUPO	Abundance Ratio Adj. P-Value: (Progressive) / (Non progressive)	0,05
HSPB1	0,42	- 2,3975225	NP	0,001	Significativo

HMGB1	0,46	-	NP	0,0385	Significativo
		2,1630559			
PADI4	0,54	-	NP	0,0009	Significativo
		1,8542654			
GAPDH	0,69	-	NP	0,0027	Significativo
		1,4594595			
CEACAM1	0,77	-	NP	0,7025	No Significativo
		1,3017621			
GRN	0,86	-	NP	0,7584	No Significativo
		1,1615756			
RHOA	0,87	-	NP	0,5043	No Significativo
		1,1513463			
F2	0,91	-1,098692	NP	0,2897	No Significativo
CAMP	0,95	-	NP	0,716	No Significativo
		1,0517241			
MMP8	0,96	-	NP	0,899	No Significativo
		1,0366886			
S100A9	1,25		PG	0,5302	No Significativo

[Proteoma FGC] and [Netosis]:	Abundance Ratio: (Progressive)	Fold change 2	GRUPO	Abundance Ratio Adj. P-Value:	0,05
--------------------------------------	---------------------------------------	----------------------	--------------	--------------------------------------	-------------

	/ (Non-progressive)			(Progressive) / (Non progressive)	
VWF	1,73081925		PG	0,56001732	No Significativo
A2M	1,19019139		PG	0,11179226	No Significativo
FERMT3	1,15519126		PG	0,06269843	No Significativo
CTSC	0,98540856	- 1,0148075	NP	0,898474	No Significativo
WAS	0,83115672	- 1,2031425	NP	0,68694328	No Significativo
SERPINB1	0,73392283	- 1,3625411	NP	0,02313633	Significativo

Necroptosis FGC					
[PP] and [Proteoma FGC] and [Necroptosis]:	Abundance Ratio: (Progressive) / (Non-progressive)	Fold change 2	GRUPO	Abundance Ratio Adj. P-Value: (Progressive) / (Non progressive)	0,05
FTH1	0,01	-100	NP	3,2E-16	Significativo

HMGB1	0,46	-2,16	NP	0,039	Signifi cativo
CTSB	0,49	-2,03	NP	0,097	No Signifi cativo
ANXA1	0,64	-1,56	NP	0,084	No Signifi cativo
ALOX15	0,64	-1,55	NP	0,4	No Signifi cativo
CDC37	0,69	-1,45	NP	0,51	No Signifi cativo
HSPA4	0,7	-1,44	NP	0,042	Signifi cativo
HSP90AB1	0,73	-1,36	NP	0,61	No Signifi cativo
PPIA	0,75	-1,33	NP	0,037	Signifi cativo
MYH9	0,81	-1,24	NP	0,23	No Signifi cativo
TXN	0,83	-1,21	NP	0,055	No Signifi cativo
MAPK14	0,87	-1,15	NP	0,94	No Signifi cativo

PYCARD	0,93	-1,07	NP	0,21	No Significativo
CAPN1	0,97	-1,03	NP	0,77	No Significativo
HSPA5	1		PG	0,21	No Significativo
LGALS3	1,03		PG	0,18	No Significativo
C5	1,04		PG	0,36	No Significativo
HNRNPA1	1,07		PG	0,7	No Significativo
CYBB	1,09		PG	0,73	No Significativo
CASP1	1,09		PG	0,49	No Significativo
SIRPA	1,13		PG	0,76	No Significativo
STAT1	1,21		PG	0,11	No Significativo

HSP90AA1	1,66		PG	0,71	No Significativo
FLOT2	100		PG	0,99	No Significativo

[Proteoma FGC] and [Necroptosis]:	Abundance Ratio: (Progressive) / (Non-progressive)	Fold change 2	GRUPO	Abundance Ratio Adj. P-Value: (Progressive) / (Non progressive)	0,05
FCGBP	1,39529412		PG	0,51875332	No Significativo
PYGM	1,27627907		PG	0,73832494	No Significativo
PYGB	1,27627907		PG	0,73832494	No Significativo
C7	0,93251534	- 1,0723684	NP	0,96692956	No Significativo
PYGL	0,91107383	- 1,0976059	NP	0,60391462	No Significativo
C6	0,85846438	- 1,1648707	NP	0,17089924	No Significativo

PDCD6IP	0,83577487	- 1,1964945	NP	0,31793076	No Signifi cativo
GLUD1	0,73163186	- 1,3668076	NP	0,04300882	Signifi cativo
GLUL	0,65705128	- 1,5219512	NP	0,16044516	No Signifi cativo
GLUD2	0,61192982	- 1,6341743	NP	0,00479727	Signifi cativo
C9	0,58515964	- 1,7089354	NP	0,2281608	No Signifi cativo
PTGES3	0,49458072	- 2,0219146	NP	0,05521354	No Signifi cativo