FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE POLIMORFISMOS DE GENES ASOCIADOS A LA VÍA DE WNT EN INDIVIDUOS SISTÉMICAMENTE SANOS Y SU ASOCIACIÓN CON VARIABLES CLÍNICAS PERIODONTALES

María Victoria Ospina Chavarro

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE PERIODONCIA Y MEDICINA ORAL - FACULTAD DE ODONTOLOGIA
BOGOTA DC. FEBRERO 2019

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Periodoncia y Medicina Oral
Título:	Frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos de genes asociados a la via Wnt en individuos sistémicamente sanos y su asociación con variables periodontales
Grupo de Investigación	Unidad de Investigación Básica Oral UIBO
Línea de Investigación:	Medicina Periodontal
Otras Instituciones participantes:	Hospital Militar Nueva Granada
Tipo de investigación:	Postgrado/grupo
Estudiante:	María Victoria Ospina Chavarro
Directora	Dra. María Consuelo Romero Sánchez
Codirectora	Dra. Sandra Janneth Perdomo Lara
Asesor metodológico:	Dra. Gloria Ínes Lafaurie Villamil
Asesor estadístico:	Dra. Leydi Lorena Chila Moreno

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LOPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA ESCOBAR	Directora Área Bioclínica
MARIA CLARA GONZÁLEZ	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología
MIGUEL FERNANDO VARGAS	Director(a)Programa de periodoncia y medicina oral
MARIA ALEJANDRA SABOGAL	Coordinador(a) Programa de periodoncia y medicina oral

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

RESUMEN

FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE POLIMORFISMOS DE GENES ASOCIADOS A LA VÍA DE WNT EN INDIVIDUOS SISTÉMICAMENTE SANOS Y SU ASOCIACIÓN CON VARIABLES CLÍNICAS PERIODONTALES

A*ntecedentes*: Los estudios que evalúan la asociación entre la presencia de SNPs asociados a la vía de modulación y resorción ósea Wnt, en sujetos sistémicamente sanos, y su relación con la presencia de periodontitis, son limitados. Estudios realizados sobre la relación de la periodontitis y su severidad con otras vías que regulan el metabolismo óseo, como la vía RANK- RANKL-OPG, han sido descrita; lo que llevaría a la necesidad de evaluar la posible relación con otras vías que tiene una función similar sobre los niveles de control y metabolismo de la masa ósea. **O*bjetivo*:** Establecer la frecuencia genotípica y alélica de polimorfismos de genes asociados a la vía de Wnt en individuos sistémicamente sanos con y sin enfermedad periodontal. ***Materiales y métodos***: Se tomaron muestras de placa subgingival, toma de índices periodontales, diagnostico de EP con el CDC y AAP, sondaje periodontal y niveles de inserción, índices serológicos y clínicos de inflamación en individuos sistémicamente sanos con y sin EP. Los SNPS de DKK, SOST, LRP5, KREMEN, fueron determinados por High Resolution Melting y se confirmaron por secuenciación. ***Resultados*:** El 57.3% de la población presentó EP, siendo el 9,6% severa. En el grupo sin EP el 67,2% presentó el SNP para DKKrs1896367 (*p=0.008)* y el 82,6% SNPs KREMEN (*P= 0.016).* Se encontró que el 85,6% de los individuos con EP presentaron SNPs para DKKrs1896368 (*p*= 0.042), colocar frecuencias de cada polimorfismo. Las frecuencias alélicas de DKK rs1896368 tales como 0,435 (42,35%), para el alelos ancestral T, y 181 alelos, que representan el 0,5764 (57,64%). Asociándose a EP DKKrs1896367 y DKKrs1896368. ***Conclusiones****: E*l 100 % de individuos que presento el SNP DKKrs1896368 presentó EP severa, y en individuos sin EP el DKKrs1896367 y kremenrs132274, hallazgos importantes como primer acercamiento a la implicación de la vía Wnt está en la EP.

***Palabras claves*:** Polimorfismo, SNPs, periodontitis, enfermedad periodontal, Wnt, LRP5, Kremen, SOST.

ABSTRACT

Genotype and Allelic Frequencies of Gene Polymorphs Associated with the Wnt Pathway on Healthy Subjects and its Association with Periodontal Clinical VariablesBackground

There is a limited number of studies which evaluate SNPs associated with the Wnt pathway of modulation and osseous resorption on systemically healthy subjects and its relation with the presence of periodontitis. These have described the relation of periodontitis and its severity with other pathways which regulate osseous metabolism such as RANK- RANKL-OPG; this leads to the need of evaluating the possible relation with other pathways with similar control and metabolism functions of osseous mass. **Objective:** To establish the genotype and allelic frequencies of gene polymorphs associated with the wnt pathway on healthy subjects with and without periodontal disease. **Materials and methods:** Sub-gingival plaque samples, periodontal indices, PD diagnosis with CDC and AAP, periodontal probing, insertion levels, serology and clinical inflammation indices were taken from systemically healthy individuals with and without PD. The SNPs of DKK, SOST, LRP5 and KREMEN were determined with High Resolution Melting and confirmed with sequencing. **Results:** 57.3% of the population presented PD with 9.6% being severe. 67.2% presented SNP for DKKrs1896367 in the group without PD (p=0.016). 85.6% of individuals with PD presented SNPs for DKKrs1896368 (p=0.042), place frequencies for each polymorphism. The allelic frequencies of DKKrs1896368 such as 0.435 (42.35%) for T ancestral alleles and 181 alleles which represent the 0.5764 (57.64%). DKKrs1896367 and DKKrs1896368 are thus associated with PD. **Conclusions:** All individuals with SNP DKKrs1896368 had severe PD and DKKrs1896367 and kremenrs132274 were present in those without PD. These are important initial findings regarding the presence of PD in the Wnt pathway.

Key words: polymorphism, SNPs, periodontitis, periodontal disease, Wnt, LRP5, Kremen, SOST.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN 1

2. MARCO TEÓRICO 4

2.1 Enfermedad periodontal 4

2.2 Polimorfismos genéticos 5

2.3 Vía de señalización de Wnt y fisiología ósea: 7

2.4 Vía de señalización Wnt asociada a patologías: 12

2.5 Enfermedad periodontal y polimorfismos asociados a la vía Wnt: 13

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 16

4. JUSTIFICACIÓN 18

5. OBJETIVOS 19

5.1 Objetivo general 19

5.2 Objetivos específicos 19

6. METODOLOGÍA DEL PROYECTO 20

6.1 Tipo de estudio 20

6.2 Lugar 20

6.3 Población y muestra 20

6.4 Selección de la muestra (cálculo de la muestra) 20

6.4.1 Criterios de inclusión 21

6.4.2 Criterios de exclusión 21

6.5 Métodos y técnicas de recolección de información 22

6.5.1 Evaluación de índices demográficos y clínicos 22

6.5.2. Evaluación de parámetros clínicos asociados a inflamación 22

6.5.3 Parámetros clínicos periodontales 22

6.5.4. Evaluación de la presencia de P. gingivalis por PCR 23

6.5.5 Inmuno-Ensayo indirecto en fase solida (ELISA) para la determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2 contra Porphyromonas gingivalis 25

6.5.6 Marcadores serológicos de inflamación y compromiso articular 26

6.5.6.1. Medición de PCR ultrasensible: (Immulite 1000, Siemens®, referencia 10286287 High sensitive PCR) 26

6.5.6.2. Medición de la velocidad Globular (VSG) 26

6.5.6.3. Medición de Factor Reumatoide IgM 26

6.5.6.4 Cuantificación de anticuerpos anti citrulinado 27

6.5.7. Evaluación de marcadores óseos de la vía WnT 27
6.5.7.1 Polimorfismos de marcadores óseos, DKK, SOST, LRP5, KREMEN 27
6.5.8 Secuenciación de ADN Automatizada 30
7. PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS 32
7.1 Hipótesis de estudio 32
7.4 Estadística descriptiva y analítica 32
8. CONSIDERACIONES ÉTICAS 33
8.1 Consentimiento informado 33
9. RESULTADOS 34
9.1 Fase descriptiva 34
9.1.1 Parámetros clínicos y demográficos 34
9.1.2 Variables serológicas asociadas a inflamación sistémica 36
9.1.3 Descripción de la frecuencia de polimorfismos únicos SNPs en la población estudias .. 38
9.1.4 Parámetros de diagnóstico periodontal e índices periodontales 40
9.1.5 Descripción de variables de diagnóstico periodontal en la población estudiada 41
9.1.6 Descripción de variables clínicas de diagnóstico periodontal 42
9.2 Fase analítica 44
9.2.1 Comparación de las parámetros sociodemográficos y clínicos demográficas entre los individuos sanos según el diagnóstico periodontal 44
9.2.2 Comparación de las variables serológicas y articulares entre los individuos según el diagnóstico periodontal 45
9.2.3 Comparación de las variables periodontales entre el grupo con EP y el grupo sin EP . 47
9.2.4 Comparación de las frecuencias de SNPs entre el grupo de EP y sin EP 47
9.2.5 Análisis de frecuencias de SNPs en individuos con EP según la severidad. 49
9.2.6 Análisis de frecuencias de SNPs en individuos con EP según la nueva clasificación de la AAP. 53
9.2.7 Descripción de las frecuencias de SNPs asociados EP severa 56
9.2.8 Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP DKK rs1896367 y parámetros de diagnóstico periodontal 58
9.2.9 Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP DKK rs1896368 y parámetros de diagnóstico periodontal 59
9.2.10 Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP DKK rs1528873 y parámetros de diagnóstico periodontal 60
9.2.11 Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP KREMEN rs132274 y parámetros de diagnóstico periodontal 60
9.2.12 Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP SOST rs6503475 y parámetros de diagnóstico periodontal 61

9.2.13 Frecuencias alélicas para los SNPs 61

9.2.14 Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896367 y su asociación con el diagnóstico periodontal..... 62

9.2.15 Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896368 y su asociación con el diagnostico periodontal..... 64

9.2.16 Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1528873 y su asociación con el diagnóstico periodontal y parámetros clínicos articulares..... 66

9.2.17 Análisis de frecuencias alélicas del SNP KREMEN rs132274 y su asociación con el diagnostico periodontal y parámetros clínicos articulares..... 67

9.2.18. Análisis de frecuencias alélicas del SNP SOST rs6503475 y su asociación con el diagnostico periodontal y parámetros clínicos articulares..... 68

9.2.19 Análisis de frecuencias alélicas del SNP LRP5 rs3736228 y su asociación con el diagnostico periodontal y parámetros clínicos articulares..... 70

9.2.20 Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896367 y su asociación con parámetros de diagnóstico periodontal..... 71

9.2.21 Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896368 y su asociación con parámetros de diagnóstico periodontal..... 72

9.2.22 Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1528873 y su asociación con parámetros periodontales...... 74

9.2.23 Análisis de frecuencias alélicas del SNP KREMEN rs132274 y su asociación con parámetros de diagnóstico periodontal 74

9.2.24 Análisis de frecuencias alélicas del SNP SOST rs6503475 y su asociación con parámetros de diagnóstico periodontal..... 75

9.2.25 Análisis de frecuencias alélicas del SNP LRP rs3736228 y su asociación con parámetros de diagnóstico periodontal..... 75

10. DISCUSIÓN 76

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 91

13. ANEXOS..... 97

13.1. Formatos de criterios de exclusión 97

13.2. Formatos de recolección de datos 98

13.3. Formato de periodontograma 99

13.4. Consentimiento informado 101

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. *Posición cromosómica de los SNPs evaluados* 11
Tabla 2. *Primers usados en el estudio (Beacon designer 8 sofware) y variantes del polimorfismo con su ubicación.* 30
Tabla 3. *Descripción de variables socio demográfica y clínica de la población de estudio* 35
Tabla 4. *Descripción de variables serológicas en la población de estudio* 37
Tabla 5. *Descripción de frecuencia de SNPs en la población de estudio* 39
Tabla 6. *Descripción de variables de diagnóstico periodontal en la población de estudio*..... 42
Tabla 7. *Descripción de variables periodontales la población de estudio* 43
Tabla 8. *Comparación de parámetros sociodemográficas y clínicos según el diagnóstico periodontal* 45
Tabla 9. *Comparación de variables serológicas según el diagnóstico periodontal* 46
Tabla 10. *Descripción de frecuencias de polimorfismos genéticos en individuos con enfermedad periodontal según la severidad* 52
Tabla 11. *Descripción de frecuencias de haplotipos de SNPs en individuos con enfermedad periodontal según la severidad* 53
Tabla 12. *Descripción de frecuencias de SNPs en individuos con enfermedad periodontal según la nueva clasificación de la AAP.*..... 55
Tabla 13. *Descripción de las frecuencias de SNPs asociados enfermedad periodontal severa* 57
Tabla 14. *Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP DKK rs1896367 y parámetros periodontales*..... 58
Tabla 15. *Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP DKK rs1896368 y parámetros periodontales*..... 59
Tabla 16. *Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP KREMEN rs132274 y parámetros periodontales*..... 61
Tabla 17. *Análisis de frecuencias alélicas de DKK rs1896367 y diagnóstico periodontal* 63
Tabla 18. *Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896368 y diagnostico periodontal* 65
Tabla 19. *Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1528873 y diagnostico periodontal* 66
Tabla 20. *Análisis de frecuencias alélicas del SNP KREMEN rs132274 y diagnostico periodontal* 67
Tabla 21. *Análisis de frecuencias alélicas del SNP SOST rs6503475 y diagnostico periodontal* 69
Tabla 22. *Análisis de frecuencias alélicas del SNP LRP rs3736228 y diagnostico periodontal* 70
Tabla 23. *Análisis de frecuencias alélicas de SNP DKK rs1896367 y parámetros periodontales* ... 71
Tabla 24. *Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896368 y parámetros periodontales* .. 73
Tabla 25. *Análisis de frecuencias alélicas del SNP KREMEN rs132274 y parámetros periodontales*..... 74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Descripción de la vía Wnt..... 11
Figura 2 Distribución de porcentaje de pacientes según el diagnóstico periodontal; (A), muestra el porcentaje de pacientes con ausencia y presencia de periodontitis según la clasificación para diagnóstico y severidad periodontal basado según criterios de la academia americana de periodoncia y el CDC. (B), porcentaje de pacientes sin periodontitis y con periodontitis, distribuidos en los diferentes estadios clasificados según la Academia Americana de Periodoncia, AAP y Federación Europea de Periodoncia, EURO . (C), porcentaje de pacientes sin periodontitis y con periodontitis, distribuidos según la severidad de la enfermedad. 41
Figura 3. Porcentaje de individuos con presencia de polimorfismos de un solo nucleótido SNP DKK 367 con ausencia y presencia de EP. 48
Figura 4. Porcentaje de individuos con presencia de polimorfismo de un solo nucleótido SNP DKK 368, con ausencia y presencia de EP. 49
Figura 5. Porcentaje de individuos con presencia de polimorfismo de un solo nucleótido SNP KREMEN 274, con ausencia y presencia de EP 49
Figura 6. Análisis de frecuencias de SNP DKK 367 en individuos con EP según la severidad 51
Figura 7. Análisis de frecuencias de SNP DKK 368 en individuos con EP según la severidad 51
Figura 8. Análisis de frecuencias de SNP KREMEN 274 en individuos con EP según la severidad 52
Figura 9. Análisis de frecuencias de SNP DKK 367 en individuos con EP según la nueva clasificación de la AAP. 54
Figura 10. Análisis de frecuencias de SNP DKK 368 en individuos con EP según la nueva clasificación de la AAP. 54
Figura 11. Análisis de frecuencias de SNP KREMEN 274 en individuos con EP según la nueva clasificación de la AAP. 54
Figura 12. Porcentaje de individuos con diagnóstico de EP severa con presencia o ausencia de SNP para DKK 368, independiente de la presencia o no de otro SNP. % de severidad clasificado según el CDC..... 57
Figura 13. Análisis de frecuencias alélicas de SNP DKK rs1896367 y parámetros periodontales... 72
Figura 14. Análisis de frecuencias alélicas de SNP DKK rs1896368 y parámetros periodontales... 73

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal (EP) o periodontitis se ha definido como una enfermedad infecciosa que provoca inflamación dentro de los tejidos de soporte de los dientes, perdida de inserción progresiva y pérdida ósea y se caracteriza por formación de bolsas y recesiones gingivales, asociada a la presencia de placa bacteriana *(AAP, 2015)*. La fisiopatología de la enfermedad se ha caracterizado en sus vías moleculares clave y, en última instancia, conduce a la activación de proteinasas derivadas del huésped que permiten la pérdida de las fibras marginales del ligamento periodontal, la migración apical del epitelio de unión, y permite la propagación apical de la biopelícula bacteriana a lo largo del superficie radicular *(Tonetti et al.; 2018)*. Se han descrito vías encargadas de la modulación y la regulación de la respuesta del tejido gingival y el proceso de remodelación ósea, cuya finalidad es la activación de células tanto del linaje osetoblastico, como osteoclastico, por medio de una gama de citocinas proinflamatorias mediadoras de su activación, cuyo desenlace es la pérdida ósea y de inserción clínica característica de la EP (*Liu et al.; 2010*). Teniendo en cuenta este fenómeno, y con la claridad de que la EP es una condición que inicia con la inflamación de los tejidos periodontales por acúmulo de placa y deficiente higiene oral, sin embargo, este fenómeno no ha sido descrito como un patrón y la razón es que el acumulo de placa dental por sí sola no es suficiente para el desarrollo de periodontitis, es necesario que el huésped presente factores de riesgo que aumenten la probabilidad de presentar esta condición *(Kinane, 2001; Kinane & Hart; 2003).*

Una de las vías más comunes descritas para explicar y sustentar el modelo de reabsorción ósea, característica de la EP, es la vía relacionada con el eje RANK/RANKL/OPG, involucrado en la diferenciación y activación de osteoclastos (*Bartold et al.; 2010; Napimoga et al.; 2014*). Sin embargo, esta no es la única vía que regula los niveles de masa ósea, otras vías descritas como la vía Wnt – catenina (vía canónica) también tiene un papel en la modulación de la homeostasis ósea, así como una implicación en la regulación del eje RANK/RANKL/OPG (*Walsh & Gravallese, 2010 ; Bartold et al.; 2010; Crotti et al.; 2003; Glass et al.; 2005*).La vía de Wnt, es una vía de señalización que participa en muchos procesos desde la embriogénesis, hasta el metabolismo adulto (*Logan et al.; 2004*). Por lo cual se ha estudiado su relación con diversas enfermedades como el cáncer óseo, artritis reumatoide, osteoporosis; enfermedades que afectan la densidad ósea,

aumentándola o disminuyéndola (*Logan et al.; 2004*). En la literatura se ha definido que en la vía Wnt, canónica, un desequilibrio causado por falla genética que afecte sus componentes, afecta la homeostasis entre la formación y la resorción ósea (*Krishan et al.;2006*).

Las proteínas que son producto de esta vía actúan sobre las células "diana", interactuando por medio de unos receptores denominados Frizzled (Fr), Lipoproteina de baja densidad (LDL) y complejo de proteína relacionada a ligando (LRP) (*Rivera et al.; 2006*). A estos receptores se unen proteínas activadoras conocidas como los Wnts, los cuales producen el ensamblaje de una vida intracelular, encargada de la activación para un perfil osteoblastico (*Xiao et al.; 2011*). Entre las moléculas antagonistas se encuentran la esclerostina (SOST), KREMEN, dickkopf (DKK), donde su unión a los receptores va a inhibir la acumulación citoplasmática de b-catenina y por lo tanto inhibir la osteoblastogenesis (*Xiao et al.; 2011*). Se ha propuesto que la alteración de esta vía puede desencadenar un factor de riesgo genético para entidades patológicas que tengan como característica la pérdida ósea. Sin embargo, la literatura que relaciona esta vía con la EP, es muy escasa. Por lo cual los polimorfismos genéticos relacionados con la producción de estas proteínas, podrían llegar a ser determinantes en la respuesta y la modulación ósea en una enfermedad como la EP (*Westendorf et al.; 2004*). Se han encontrado niveles locales y circulantes de las proteínas SOST y DKK en sujetos sistémicamente sanos con periodontitis crónica (*Napimoga et al.; 2014*). Donde los resultados demostraron que SOST y DKK-1 estaban regulados positivamente en los tejidos periodontales de los sujetos con periodontitis crónica, lo que sugiere que estas moléculas pueden estar involucradas en las enfermedades periodontales (*Napimoga et al.; 2014*). Se ha estudiado la relación de SNPs relacionados con componentes de esta activación e inhibición de esta vía que están relacionados con enfermedades sistémicas inflamatorias con componentes que afectan la masa ósea en los individuos como al AR y la osteoporosis. (*Westendorf et al.; 2004; Rooy et al.; 2012; Miao et al.; 2013*). Diferentes polimorfismos genéticos se han encontrado en estudios con pacientes AR; de Rooy et al.; [2012] han sugerido diferentes polimorfismos de alelos homocigotos que se han relacionado con una mayor erosiono sea y articular; en DKK se ha encontrado 6 polimorfismos genéticos con asociación a AR, en cuanto a KREMEN, un polimorfismo genético tuvo asociación, en SOST 1 alelo con polimorfismo homocigoto menor tuvo asociación son aumento de esta molécula, y en cuanto a LRP5, se encontró un polimorfismo asociado. (*Rooy et al.; 2012*).

Teniendo en cuenta la poca disponibilidad en la literatura sobre la evaluación de esta vía de señalización en relación con EP, este estudio busca establecer la frecuencia genotípica de polimorfismos de genes asociados a la vía de Wnt en individuos sistémicamente sanos con y sin enfermedad periodontal.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal o periodontitis se ha definido como una enfermedad infecciosa que provoca inflamación dentro de los tejidos de soporte de los dientes, perdida de inserción progresiva y pérdida ósea y se caracteriza por formación de bolsas y recesiones gingivales (*AAP, 2015*). La fisiopatología de la enfermedad se ha caracterizado en sus vías moleculares clave y, en última instancia, conduce a la activación de proteinasas derivadas del huésped que permiten la pérdida de las fibras marginales del ligamento periodontal, la migración apical del epitelio de unión, y permite la propagación apical de la biopelícula bacteriana a lo largo del superficie radicular *(Tonetti et al.; 2018)*. La formación de biopelículas bacterianas inicia la inflamación gingival; sin embargo, el inicio y la progresión de la periodontitis dependen de los cambios ecológicos disbióticos en el microbioma en respuesta a los nutrientes de los productos inflamatorios gingivales y de degradación de tejidos *(Tonetti et al.; 2018)*.

La progresión de la pérdida de inserción suele ocurrir lentamente, pero pueden ocurrir períodos de progresión rápida *(Armitage, 2004*). Es evidente que la enfermedad periodontal en humanos tiene etiología multifactorial, derivada del desarrollo de biofilm en el entorno subgingival, factores sociales y de comportamiento, y rasgos genéticos o epigenéticos, los cuales son modulados y controlados por la respuesta inmune e inflamatoria subyacentes del hospedador (*Liu et al.; 2010*).

Existen al menos dos vías principales que regulan el equilibrio del tejido gingival y la remodelación ósea y el control posterior de la pérdida ósea periodontal. El primero, involucra las interacciones con los osteoblastos y combinan la formación ósea y la reabsorción durante los procesos fisiológicos de remodelación ósea mediada por una gama de factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de fibroblastos básico y factor de crecimiento similar a insulina, ejercen sus actividades a través de sus receptores sobre los osteoblastos para estimular la formación de hueso nuevo (*Liu et al.; 2010*).

La segunda vía trata de las citocinas, mediadores inflamatorias y osteoclastogénicos que se producen durante la inflamación o trauma de tejidos locales o retos sistémicos y son por lo tanto

responsables de la pérdida ósea en condiciones patológicas como la autoinmunidad (*Liu et al.; 2010*).

El papel de la placa bacteriana en el desarrollo de la periodontitis se ha estudiado por decadas atrás (*Liu et al.; 2010*); donde se ha estudiado la influencia de periodontopatogenos como *P. gingivalis* asociados a la etiología de esta entidad; describiendo que esta entidad iniciaba con una inflamación de los tejidos periodontales por acúmulo de placa y deficiente higiene oral; y que esta podría prolongarse y extenderse, afectando tejidos como el ligamento periodontal y el hueso alveolar, dando como resultado ya una periodontitis (*Tatakis, D et al.; 2005*).

Sin embargo, no en todos los pacientes ocurre este patrón; y la razón es que el acumulo bacteriano en la placa dental es necesaria pero no suficiente por sí misma para el desarrollo de periodontitis, es necesario que el huésped sea susceptible, presentado algún factor de riesgo, ya sea ambiental o genético, que aumente esta susceptibilidad *(Kinane, 2001; Kinane & Hart; 2003).* Se han descrito varios mecanismos subyacentes a la respuesta inmune del huésped contra la infección periodontal en un intento de explicar la fisiopatología implicada en la resorción ósea de las enfermedades periodontales (*Bartold et al.; 2010; Napimoga et al.; 2014;*).

Vías de señalización óseo, como el eje de receptor activador del factor kappa B, OPG (OSTEOPROTEGERINA)/RANK (RECEPTOR ACTIVADOR DEL FACTOR NUCLEAR KAPPA BETA) /RANKL (LIGANDO PARA EL RANK), que está involucrado en la diferenciación y activación de osteoclastos, se ha convertido un eje de estudio importante en trastornos que involucran pérdida ósea como la artritis reumatoide, e incluso la periodontitis (*Bartold et al.; 2010; Crotti et al.; 2003*). Sin embargo, otras vía de señalización como la Wnt b-catenina (vía canónica Wnt), también se han implicado en la regulación de la homeostasis ósea, con su activación que conduce a un aumento de la masa ósea, y su inhibición que conduce a una disminución de esta misma; por lo que podría ser otra mecanismo que estuviera relacionada con la susceptibilidad del hospedero a desarrollar periodontitis con perdida óseas severas (*Walsh & Gravallese, 2010 ; Bartold et al.; 2010; Crotti et al.; 2003; Glass et al.; 2005*).

2.2 Polimorfismos genéticos

Estos mecanismos mantiene la homeostasis de la masa ósea de manera fisiológica, sin embargo existen factores que afectándolos causan el rompimiento de este equilibrio; entre los cuales se

pueden encontrar los polimorfismos genéticos, que se han definido como variantes del genoma que aparecen como mutaciones, se adquieren en la descendencia y aparecen con una frecuencia en la población tras múltiples generaciones hereditarias (*Iniesta et al.; 2005*). Estos pueden ser beneficiosos o perjudicar a los individuos, porque pueden llegar a estar asociado con enfermedades (*Iniesta et al.; 2005*).

Existen diferentes polimorfismos, están los de alta penetrancia que son aquellos donde los portadores de la variante tienen una alta probabilidad de manifestar la enfermedad, pero son de muy baja frecuencia; por otro lado, se describen los polimorfismos de baja prenetrancia, los cuales se dan con mayor frecuencia en las poblaciones y pueden influir en el riesgo de padecer en la enfermedad o proporcionan susceptibilidad genética, pero para su expresión especifica el individuo necesita tener una exposición (*Iniesta et al.; 2005*).

Por lo cual, se define una relación "inversa" entre la penetrancia y la frecuencia, cuando más penetrante en un polimorfismo, menos frecuente es en la población, y es en ese punto donde se considera se define como una mutación (*Porta, M.; 2003*); sin embargo, por lo general las enfermedades crónicas, de origen genético, son el resultados de una interacciones entre la composición genética o también conocido como el genoma, específica para cada característica del individuo con el medio ambiente (*Porta, M.; 2003; Sharma et al.; 2015*).

Los polimorfismos que se encuentran con una mayor frecuencia en la población, son de una sola base nitrogenada componente del ADN, es decir; son llamados polimorfismos de un solo nucleótido o de nucleótido único SNP (*Iniesta et al.; 2005*); este cambio pueden ocurrir de diferentes maneras en todo el genoma, incluso en la zona de ADN que se encarga de la codificación de una proteína específica, afectando el resultado de esta o incluso modificando totalmente su función (*Pandolfo & Friedreich´s, 1999*).

A cada posible variante descrita se le denomina alelo, y a la posición específica de este en un gen se le denomina locus. Cuando se tratan de SNP, se refiere a que se dan dos cambios de alelos en un locus específico (*Pandolfo & Friedreich´s, 1999*).

La pareja de alelos observada en un locus específico es a lo que se le denomina genotipo, y se puede definir si es homocigoto o heterocigoto, se denomina homocigoto cuando los dos alelos

corresponden a la misma base, y heterocigoto cuando los dos alelos corresponden a bases diferentes (*Iniesta et al.; 2005; Porta, M.; 2003*).

En la actualidad, el estudio de los SNP, e incluso de los polimorfismos en general, es considerado un punto importante para la ciencia; debido a que están relacionados con múltiples enfermedades o condiciones que predisponen a los individuos a padecer diversas enfermedades, e incluso se podrían considerar dianas terapéuticas para el tratamiento del individuo. En enfermedades como la autoinmunes donde varias enfermedades comparten factores de origen genéticos que llevan a similitudes en la fisiopatología de la enfermedad (*Sirota et al.; 2009*).

En la literatura se ha encontrado que hay SNP relacionados con enfermedades con diferentes o similares fisiopatologías que son consideradas autoinmunes. En un estudio realizado en pacientes con diferentes enfermedades autoinmunes en comparación con controles sanos, se demostró el SNP rs2076530 en el gen del complejo de histocompatibilidad 2 (MHC II), está asociado con AR, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo I, sarcoidosis y lupus eritematoso (*Sirota et al.; 2009*).

Se han evidenciado SNP en pacientes con hiperglicemia, en un estudio de reportó que los polimorfismos encontrados en los genes HindIII y S447X que codifican para la LPL (lipoproteinlipasa) contribuyen a una variación en los niveles de triglicéridos totales y plasmáticos en el estudio de una muestra de pacientes diabéticos (*Soland et al.; 2006*).

Igualmente, se reportó en un estudio que el SNP heterocigoto del gen LRP5 está relacionado con el inicio de la osteoporosis temprana, y que este es uno de los factores por el cual se dio inicio al estudio de esta condición primeramente (*Hartikka et al.; 2005*). También se han encontrado relación de presencia de SNP con disminución de la masa ósea, donde se reporta que el SNP mas asociado es el LRP rs3736228 a una densidad ósea baja (*Richards et al.; 2008*).

Partiendo de estos hechos, se evidencia que los SNP están relacionados con diferentes tipos de enfermedades, siendo tanto como un iniciador o causal, así como un agravante para las mismas, por lo que se han tomado en cuenta como un índice importante para el desarrollo de la ciencia y el mayor entendimiento de la fisiopatología de las enfermedades así como de su tratamiento o enfoque terapéutico.

2.3 Vía de señalización de Wnt y fisiología ósea:

La vía de Wnt, es una vía de señalización que participa en muchos procesos desde la embriogénesis, hasta el metabolismo adulto (*Logan & Nusse, 2004*). Por lo cual se ha estudiado su relación con diversas enfermedades como el cáncer óseo, artritis reumatoide, osteoporosis; enfermedades que afectan la densidad ósea, aumentándola o disminuyéndola (*Logan & Nusse, 2004*).

Se ha evidenciado que esta vía regula la diferenciación, activación y función de los osteoblastos determinando la formación ósea en la etapa embrionaria y la etapa postnatal (*Napimoga et al.; 2014)*.

La vía canónica o dependiente de b-catenina, es la vía intracelular que se ha relacionado con la regulación de la biología ósea, ya que si la producción y acumulación citoplasmática de esta molécula aumenta, aumenta la capacidad de mineralización ósea (*Krishan et al.; 2006*). En la literatura se ha definido que en la vía Wnt, canónica, un desequilibrio causado por falla genética que afecte sus componentes, afecta la homeostasis entre la formación y la resorción ósea (*Krishan et al.; 2006*).

Las proteínas asociadas a esta vía de señalización son pleiotrópicas, y sus efectos pueden regular desde la expresión y diferenciación celular, como la expresión mitogenica (*Rivera et al.; 2006*). Las proteínas que son producto de esta vía actúan sobre las células "diana", interactuando por medio de unos receptores denominados Frizzled (Fr), Lipoproteina de baja densidad (LDL) y complejo de proteína relacionada a ligando (LRP). Estos ensamblan una respuesta intracelular donde participan varios componentes como el regulador B- catenina, que aumenta al haber interacción con los receptores de membrana, esta a su vez interactúa con factores de transcripción nucleares (*Logan et al.; 2004; Rivera et al.; 2006*).

En los componentes de esta vía intracelular se encontraran receptores, así como ligandos activadores o agonistas e inhibidores o antagonistas. Entre los receptores encontramos los co-receptores asociados a los Frizzled, LRP5 y LRP6, que al interactuar con ligandos activadores (Wnt-5,10), desencadenan el ensamblaje de la vía intracelular que inhibe la degradación proteosómica de la b-catenina, permitiendo que se dé su translocación nuclear (*Xiao et al.; 2011*). Entre las moléculas antagonistas se encuentran la esclerostina (SOST), KREMEN, dickkopf (DKK), donde su unión a los receptores va a inhibir la acumulación citoplasmática de b-catenina (*Xiao et al.; 2011*).

Las proteínas KREMEN y DKK, son reguladores de la activación y ensamblaje de la vía intracelular; al unirse conjuntamente e interactuar con los receptores LRP5 y LRP6 van a provocar una internalización de este complejo para ser degradado de manera intracelular impidiendo la activación de la vía intracelular (*Xiao et al.; 2011*). También la proteína esclerostina; SOST, es una molécula considerada reguladora de esta vía; al interactuar con los receptores LRP5 y LRP6, va a desencadenar igualmente la internalización de este complejo y su posterior degradación, impidiendo así la interacción de estos receptores con moléculas coestimuladoras y activadores de esta vía (*Logan & Nusee, 2004*; *Xiao et al.; 2011; Velasco & Riancho, 2008*).

El proceso de degradación de estos complejos formados por los receptores y moléculas reguladoras va a desencadenar el ensamblaje de un complejo interno compuesto por moléculas como la molécula APC (poliposis coli adenomatasa), axina y glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) que son consideradas moléculas inhibidoras internas de esta via (*Logan & Nusee, 2004*), las cuales van a formar un complejo intracelular que va a unirse a la b-catenina, provocando su ubiquitinación y posterior degradación proteosomica, evitando que se dé su translocación nuclear y regule la expresión genética específica para un perfil osteoblastico (*Logan & Nusee, 2004*; *Xiao et al.; 2011*).

Por el contrario, si las proteínas activadores, Wnts se unen a sus receptores LRP, esta unión desencadena la inhibición de moléculas reguladoras como la APC Y GSK3, teniendo como resultado la producción de b-catenina y su acumulo citoplasmático, su posterior translocación nuclear y la expresión genética de RUNX2, factor de transcripción especifico del linaje osteoblastico (*Logan & Nusee, 2004*; *Xiao et al.; 2011*).

Los receptores que conforman esta vida de señalización se encuentran en las células pre-osteoblasticas, por lo que se ha estudiado en modelos de animales e in-vitro la capacidad de diferenciación aumentada de las células óseas, al entrar en contacto con activadores de esta vía como Wnt10b, que corresponde a una de las proteínas activadoras más estudiadas de esta vía, y tiene la capacidad de unirse a los receptores LRP, dando como resultado la producción de b-catenina intracelular (*Westendorf et al.; 2004).*

Las variaciones genéticas o conformacionales de estas moléculas encargadas de la regulación de esta vía, pueden provocar un desequilibrio o incluso una función insuficiente, por lo que puede ser considerado un factor de riesgo, y un medidor de enfermedades del metabolismo óseo (*Rooy et al.; 2012)*. Para las diferentes moléculas de esta vía y que serán objeto de estudio en este trabajo, se

han encontrado alelos que presentan SNP, así como reportado alelo nativos, por ejemplo; se ha encontrado que en la búsqueda para los SNP del gen DKK rs1896367, se encuentra ubicado en el cromosoma 10:52309426, a 4984 pb al lado 3´ del precursor de DKK1, el nucleótido ancestral seria G (guanina) con un nucleótido antisentido o sentido 3´C (citosina) que sería el genotipo nativo, por lo que lo normal sería encontrar GG, encontrar la variante nos daría la marcación de que hay un SNP, por otro lado, su variante se ha descrito como A (adenina), con su antisentido T (timina) que sería el SNP heterocigoto y se describiría GA, que sería descrito como AA o TT que sería el SNP homocigoto (*Cardona et al.; 2018*) (tabla 1).

También para DKK rs1896368 el cual se encuentra localizada en el cromosoma 10:52309144 a 5266 pb al lado 3´del precursor de DKK1, en donde el nucleótido ancestral es A con su complementario T que se describiría como AA, y su variante es G con su complementario C; el cual sería definido como el SNP y se describiría AG si es heterocigoto, y GG si es homocigoto (*Mil genomas.; ncbi*) (tabla 1).

Para DKK rs1528873 el cual se encuentra localizada en el cromosoma 10:52342245 a 25413 pb al lado 5´del precursor de DKK, su nucleótido ancestral es T con su complementario A que se describiría como TT, y su variante es G con su complementario C, que se describiría como GG homocigoto y heterocigoto TG (*Mil genomas.; ncbi*) (tabla 1).

Igualmente para el gen SOST, se ha definido el nucleótido genotipo nativo y las variantes para considerar un SNP; para SOST rs6503475 el cual se encuentra ubicado en el cromosoma 17:43733640, a 21677 pb al lado 3´ del precursor de Esclerostina, el nucleótido ancestral es A con su complementario T que se describiría como AA, y su variante es G con su complementario C que se describiría como AG heterocigoto, y como GG homocigoto (*Mil genomas.; ncbi*) (tabla 1).

Para KREMEN rs132274 el cual se encuentra ubicado en el cromosoma 22:29129138, a asociado al precursor de la proteína Kremen, el nucleótido ancestral es C con su complementario G que se describiría CC, y su variante es T con su complementario A que se describiría CT para heterocigoto, y como TT para homocigoto (*Mil genomas.; ncbi*) (tabla 1).

Para LRP5 rs3736228 el cual se encuentra ubicado en el cromosoma 11:68433827, el nucleótido ancestral es C con su complementario G que se describiría como CC, y su variante es T con su

complementario A que se describiría como CT para heterocigoto, y como TT para homocigoto (*Mil genomas.; ncbi*) (tabla 1).

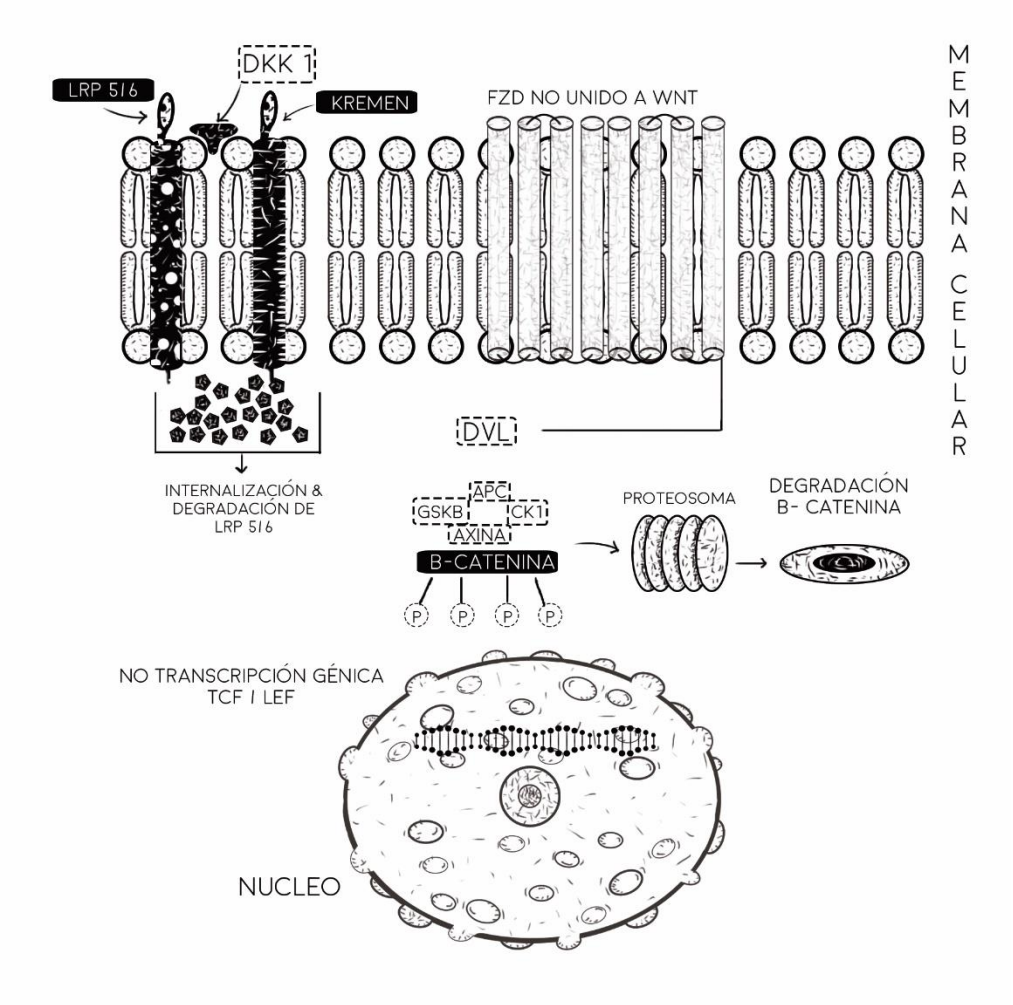


Figura 1. Descripción de la vía Wnt

Tabla 1. *Posición cromosómica de los SNPs evaluados*

Secuencia	Posición cromosómica
(DKK) rs1896368	Cromosoma 10 q21.1
(DKK) rs1896367	Cromosoma 10 q21.1
(DKK) rs1528873	Cromosoma 10 q21.3
(SOST475) rs6503475	Cromosoma 17 q 21.3

(KREMEN) rs132274	Cromosoma 22 q12.2
(LRP5) rs3736228	Cromosoma 11 q13.2

2.4 Vía de señalización Wnt asociada a patologías:

La vía de Wnt ha sido relacionada con enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide AR (*Westendorf et al.; 2004; Rooy et al.; 2012*).

La b-catenina es el factor regulador de la expresión de la vía canónica de la Wnt, que es la que más influencia el metabolismo óseo (*Westendorf et al.; 2004*). Xia et al, encontró niveles altos de b-catenina en muestras de líquido sinovial de pacientes con AR (*Xiao et al.; 2011*).

En la relación que se presenta entra la AR y Wnt, se ha sugerido que la señalización celular mediada por ligandos activadores como Wnt5, contribuye al aumento de citoquinas y moléculas proinflamatorias, que son características de la AR (*Miao et al.; 2013*).

Estos hallazgos sugieren que la vía de señalización de Wnt mediada por Wnt5 participa en la promoción de la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, que facilita la infiltración de leucocitos y la activación en las articulaciones sinoviales durante el desarrollo de AR (*Miao et al.; 2013*).

Sen et al [2001], demostró en un estudio *in vitro* que la señalización mediada por Wnt-5 al receptor Fr en fibroblastos de pacientes con AR, puede promover una mayor producción de IL-6, IL-15 y RANKL, y así contribuir a la destrucción del cartílago y erosión ósea (*Sen et al.; 2001*).

Los niveles altos y la sobreproducción de moléculas en pacientes con diagnóstico de AR, se ha ligado a la presencia de polimorfismos genéticos presentes en la vía canónica (*Sen et al.; 2001*). Un polimorfismo se define como la presencia; en una población, de dos o más formas, producidas cuando diferentes alelos de un gen se producen en la misma población y el alelo más raro no se mantiene (es decir, tiene una frecuencia superior a, por ejemplo, 0,05%).

Diferentes polimorfismos genéticos se han encontrado en estudios con pacientes AR; de Rooy et al.; [2012] han sugerido diferentes polimorfismos de alelos homocigotos que se han relacionado con una mayor erosiono sea y articular; en DKK se ha encontrado 6 polimorfismos genéticos con asociación a AR, entre los cuales se describían DKK 367, 368 y 873, estaban asociados con el daño articular en pacientes con AR, y el más frecuente fue el DKK 368, el cual se asociaba

significativamente con una severidad mayor de daño articular, en cuanto a KREMEN, un polimorfismo genético tuvo asociación, en SOST entre los cuales se encuentran SOST 479 y 475 asociados significativamente a un daño articular severo, y en cuanto a LRP5 entre los que se encuentra LRP5 373, asociado igualmente a severidad del daño articular (*Rooy et al.; 2012*).

En una revisión de WESTENDORF et al.; [2004], reportó que la presencia de polimorfismos genéticos SNPs para LRP5, específicamente el LRP5 373, se presentaba en enfermedades de alteraciones óseas como AR y osteoporosis, presentando una densidad ósea deficiente y un proceso de resorción con destrucción crónica (*Westendorf et al.; 2004*).

Un estudio reporto que la falta de expresión de esclerostina es la causa de esclerosteosis y la enfermedad de Van Buchem (displasia de esclerosante ósea); mientras que la pérdida de la función de mutación del gen LRP5 es la causa del síndrome de osteoporosis-pseudogliomas (*Rossini et al.; 2013*).

En la literatura se ha propuesto que la vía de señalización Wnt-b-catenina, y sus antagonistas SOST y DKK1, juegan un papel importante en la fisiopatología de varias afecciones como la osteoporosis, la artritis reumatoide, la metástasis ósea cáncer, espondilitis anquilosante y mieloma múltiple (*Manolagas, 2014*).

En un estudio realizado en se encontró que los individuos heterocigotos para el polimorfismo rs1896367 de DKK-1 tuvieron erosiones más frecuentes y estrechamiento del espacio articular y presencia de erosiones más frecuentes (*Cardona et al.; 2018*).

El SNP en el gen LRP5 (rs3736228) se asoció con una disminución de la densidad mineral ósea, osteoporosis y un mayor riesgo de fractura osteoporótica, independientemente de su efecto sobre la densidad mineral ósea, lo que sugiere que los efectos de esta variante sobre el riesgo a la fractura puede ser dependiente o independiente de la densidad mineral ósea (*Richards et al.; 2008*).

2.5 Enfermedad periodontal y polimorfismos asociados a la vía Wnt:

Los polimorfismos se han asociado a múltiples enfermedades, no como factor causal propiamente dicho, sino como un factor de susceptibilidad para desarrollar diferentes, entre las cuales podemos encontrar la artritis reumatoide, la diabetes mellitus, la osteoporosis, entre otras. Un polimorfismo se define como la presencia; en una población, de dos o más formas, producidas cuando diferentes

alelos de un gen se producen en la misma población y el alelo más raro no se mantiene (es decir, tiene una frecuencia superior a, por ejemplo, 0,05%) (*Kinane, 2001*).

Se ha reportado que la presencia de periodontitis se asoció con la expresión homocigótica del polimorfismo rs 1896367 de DKK-1 (p = 0,009) y la expresión heterocigótica del polimorfismo rs1696368 DE DKK-1 (p = 0,033); concluyendo así que los polimorfismos DKK-1 pueden asociarse con la presencia de daño óseo en pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide temprana y podría afectar los resultados periodontales (*Cardona et al.; 2018*).

La EP, se ha asociado con factores de riesgo que aumentan la susceptibilidad del hospedero para desarrollarla; entre esos factores se encuentran los factores genéticos (*Kinane, 2001*).

Una característica de la patogénesis de la EP, es un desequilibrio entre el eje osteoblastico – osteoclastico (*Bostanci & Belibasakis, 2012*). La vía de Wnt, b-catenina, es fundamental en la diferenciación de osteoblastos, esta vía y sus componentes han sido estudiados en relación con enfermedades como la artritis reumatoide, la osteoporosis e incluso con cáncer óseo (*Boyle & Simonet, 2003*); pero su papel en relación a EP no es muy claro ni ha sido ampliamente investigado.

Gao, H; et al, en un estudio realizado en pacientes con diagnóstico de dislipidemia y periodontitis de población China, reportó que los individuos con polimorfismos de LRP5, (rs682429-AA o rs312016-GG), presentaban una asociación con la presencia o no de EP (*Gao et al.; 2015*).

Los estudios de presencia de polimorfismos asociados a marcadores óseos relacionados de la vía Wnt, en paciente sistémicamente sanos con periodontitis, son escasos.

Solo se encontró hasta la fechas evaluaciones de la proteína en tejido o en suero; Napimoga et al, reporta uno de los primeros estudios que evalúa los niveles locales y circulantes de las proteínas SOST y DKK en sujetos sistémicamente sanos con periodontitis crónica (*Napimoga et al.; 2014*).

Donde los resultados demostraron que los niveles de proteínas SOST y DKK-1identificadas por mRNA, eran significativamente altos en el grupo de los sujetos con periodontitis crónica, lo que sugiere que estas moléculas pueden estar involucradas en las enfermedades periodontales (*Napimoga et al.; 2014*). Los niveles significativamente altos de proteína SOST se han evidenciado en pacientes que se diagnosticaron con periodontitis que son sistémicamente sanos (*Napimoga et al.; 2014*). Sin embargo, este estudio reporta la presencia de las proteínas identificadas en fluido crevicular, y no evaluaron las frecuencias genotípicas de los SNPs.

Un estudio realizado en la Unidad de Investigación Básica Oral-UIBO, Universidad el Bosque; se reportó la presencia del polimorfismo rs1896367 correspondiente a DKK-1 se encontró en el 43,4% y para rs1896368 correspondiente a DKK-1 fue del 87,5%, con frecuencias similares en AR y controles (*Cardona et al.; 2018*). La presencia de EP se asoció más en este estudio con SNPs homocigoto de DKK 367, y SNPs heterocigoto DKK 368 (p=0.033) (*Cardona et al.; 2018*).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad periodontal o periodontitis se ha definido como una enfermedad infecciosa que provoca inflamación dentro de los tejidos de soporte de los dientes, perdida de inserción progresiva y pérdida ósea y se caracteriza por formación de bolsas y / o recesión gingival (*AAP, 2015*).. La enfermedad suele asociarse con la presencia de placa y cálculo (*Armitage, 2004*). La progresión de la pérdida de inserción suele ocurrir lentamente, pero pueden ocurrir períodos de progresión rápida. *(AAP, 2015; Armitage, 2004).* Es causada principalmente por bacterias orales, especialmente anaerobios Gram (-) las cuales se adhieren a la superficie dental extendiéndose hacia las bolsas periodontales (*Bahekar et al.; 2007*). Una característica principal de la enfermedad periodontal es la inflamación prolongada en los tejidos periodontales, esta respuesta inflamatoria; que podría ser normal, se ha descrito como una de las principales causas de la pérdida ósea alrededor de los dientes, y debido a la presencia de infiltrado inflamatorio persistente, puede generarse una perdida en la homeostasis de la respuesta inmune del hospedador, provocando una mayor actividad osteoblàstica, sin un aumento correspondiente en la formación ósea (4).· Este proceso puede resultar en una respuesta inflamatoria sistémica (*Hansen et al.; 2016*).

Se ha estudiado la relación que hay entre diferentes factores de riesgo, como enfermedades sistémicas de base como la artritis reumatoide, que puede desencadenar la perdida de este equilibrio inmunológico y asociarse a la presencia e incluso severidad de la periodontitis (*Kinane, 2001*). La vía que involucra RANK/ RANKL/ OPG, se asocia con patrones de pérdida ósea y ha sido muy estudiada en la artritis reumatoide dada su patogenia (*Walsh & Gravallese, 2010; Boyle & Simonet, 2003*); el desequilibrio de este eje inmunitario puede provocar pérdida ósea en varios huesos del cuerpo humano. Actualmente se contempla la posibilidad de un modelo inmunológico que involucra esta vía de regulación ósea, con la pérdida ósea a nivel periodontal (*Walsh & Gravallese, 2010*).

Algunos autores como Napimoga 2014, Walsh 2010, Mercado 2001, hablan de la relación sistémica que hay entre una enfermedad como lo es la artritis reumatoide y la pérdida ósea periodontal, encontrando asociaciones que indican que están dos entidades podrían compartir una respuesta inmunológica común que conlleva a la perdida de los tejidos periodontales (*Napimoga et al.; 2014; Walsh & Gravallese, 2010; Mercado et al, 2001*).

Napimoga et al.; [2014], ha sugerido, que la artritis reumatoide está relacionada con vías de regulación de resorción ósea como lo es la vía Wnt, ya que esta vía influye tanto en la diferenciación de osteoblastos como en la activación de los osteoclastos (*Napimoga et al.; 2014*). Así que la presencia de un desequilibrio dado por un cambio genético en esta vía podría provocar una pérdida ósea mayor en diferentes zonas del cuerpo (*Bartold et al.; 2010*). Esta vía se compone de varios componentes como receptores de membrana, componentes intracelulares, antagonistas y ligandos; que al activarse mantienen la homeostasis ósea. Pero aun así, conociendo las implicaciones de esta vía, es muy poca la evidencia que la relacione con la periodontitis, y en la mayoría de estos estudios los pacientes presentan enfermedades sistémicas de base como osteoporosis, artritis, artrosis, y otras (*Bartold et al.; 2010; Rooy et al.; 2012*).

De Rooy et al.; [2012], ha reportado que la vía de señalización de Wnt / β-catenina, en particular, es conocida por su papel fundamental en la homoeostasis ósea. Se ha descrito que el portar más de un SNPs asociado a los componentes de esta vía como lo son SOST, DKK, aumenta el riesgo a susceptibilidad y progresión de enfermedades de destrucción ósea en pacientes con presencia de artritis, y que podrían estar relacionadas con otras entidades que compartan vías similares (*Rooy et al.; 2014*).

La evidencia que relaciona la presencia de alteraciones o cambio genéticos relacionados con esta vía en individuos sistémicamente sanos pero con presencia de enfermedad periodontal es casi nula (*Bartold et al.; 2010*). Por lo que este estudio podría contribuir a crear una visión inicial de si los individuos que presentan enfermedad periodontal pueden presentar polimorfismos genéticos asociados con los componentes de la vía de la Wnt, que modeulen el desarrollo de la enfermedad y esto pudiera llegar a ser un factor adicional para ser susceptible a la presencia de esta entidad, así como se ha demostrado con otros mediadores como el eje RANKL/RANK/OPG o incluso polimorfismos en interleucinas como IL1 (*Liu et al.; 2010; Logan & Nusse.; 2004*).

4. JUSTIFICACIÓN

En individuos sistémicamente sanos, la razón por la que pueda darse una entidad como la periodontitis suele ser procesos disbioticos en el organismo. Dichos procesos pueden estar relacionados con susceptibilidad del individuo a desarrollar o no periodontitis, y que tan severa pueda llegar a ser. Entre los factores que puedan desencadenar entidades como esta, se ha encontrado una relación entres polimorfismos genéticos asociados a citoquinas presentes en el organismo como IL1, IL6, TNFa; o también SNPs asociados a vías como el eje RANK/RANKL/OPG, que podrían ser una razón para el desarrollo de EP *(Liu et al.; 2010*).

Sin embargo, hay muchas vías de regulación de biología ósea fisiológica, una de estas corresponde a la vía Wnt, la cual participa activamente manteniendo un equilibrio entre la formación y la resorción ósea. Esta vía ha sido estudiada en pacientes que presentan condiciones sistémicas como la artritis reumatoide; ya que en estos pacientes, esta vía puede encontrarse en desequilibrio o presentar alguna variabilidad genética; en oportunidades tener un polimorfismo puede generar que aumente la producción de componentes como el DKK y su unión a receptores LRP5 y 6, afectando la producción ósea y permitiendo el proceso de resorción. Se han encontrado altos niveles de DKK, SOST y KREMEN en pacientes con AR (*Xiao et al.; 2011*).

La evidencia de estudios de polimorfismos relacionados con la vía Wnt en individuos sistémicamente sanos, con y sin EP es muy escasa. Es por esta razón que este estudio busca evaluar si en sujetos sistémicamente sanos con enfermedad periodontal, hay una mayor presencia de SNPs asociados marcadores óseos de la vía de Wnt canónica frente a controles sanos sin EP y con esto aportar factores genéticos asociados a susceptibilidad para desarrollar EP o mayor severidad.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Establecer la frecuencia genotípica y alélica de polimorfismos de genes asociados a la vía de Wnt en individuos sistémicamente sanos con y sin enfermedad periodontal.

5.2 Objetivos específicos

- Identificar la presencia y frecuencia genotípica y alélica de polimorfismos de genes DKK, KREMEN, SOST, LRP5/6 en pacientes sistémicamente sanos.
- Comparar la frecuencia alélica y genotípica de polimorfismos de genes asociados a la vía de Wnt en individuos sistémicamente sanos con y sin enfermedad periodontal.
- Establecer la asociación entre polimorfismos de genes asociados a la vía de Wnt en individuos sistémicamente sanos con variables clínicas y de severidad periodontal

6. METODOLOGÍA DEL PROYECTO

6.1 Tipo de estudio
Estudio descriptivo de corte transversal

6.2 Lugar
Servicio de Reumatología Hospital Militar Central e Instituto UIBO, Universidad El Bosque.

6.3 Población y muestra

Individuos controles en un rango de edad de 30 a 65 años, sistémicamente sanos que fueron clasificados en dos grupos tengan EP y sin EP, por la clasificación de AAP (*Periodontitis.; 2015*) que estén participando en el proyecto **"***Seguimiento de la actividad clínica reumática en individuos con riesgo de desarrollar Artritis Reumatoide y de pacientes en estados tempranos de la enfermedad asociados a indicadores periodontales"***–**Colciencias convocatoria de salud 2014-657**,** y en el estudio aprobado por convocatoria interna de la institución, "*Asociación de marcadores óseos y anticuerpos anti carbamilados relacionados con índices periodontales y de actividad reumatológica en pacientes con AR temprana y en familiares en primer grado de pacientes con AR" convocatoria 2015- 047* en Bogotá.

También por la clasificación la severidad de la enfermedad periodontal según el CDC *(Eke et al.; 2012*) y la clasificación según la AAP (2018), donde se clasifica casos de periodontitis, por estadios de la enfermedad (*Pappapanou et al.; 2018*).

6.4 Selección de la muestra (cálculo de la muestra)

Se realizó muestreo por conveniencia, donde se reclutaron individuos que cumplan criterios de inclusión **"***Seguimiento de la actividad clínica reumática en individuos con riesgo de desarrollar Artritis Reumatoide y de pacientes en estados tempranos de la enfermedad asociados a indicadores periodontales* y "*Asociación de marcadores óseos y anticuerpos anti carbamilados relacionados con índices periodontales y de actividad reumatológica en pacientes con AR temprana y en familiares en primer grado de pacientes con AR"* que asistan al Hospital Militar Central e Instituto Fernando Chalem, servicios de reumatología, a partir de la fecha de aprobación de este estudio.

La muestra se dividió en dos grupos por conveniencia, 157 individuos sanos sistémicamente, 90 con periodontitis y 67 sin periodontitis.

6.4.1 Criterios de inclusión

- Individuos sistémicamente sanos, sin ningún antecedente de enfermedad sistémica, autoinmune ni infecciosa
- Individuos mayores de 18 y menores de 65 años.
- Individuos que firmen el consentimiento informado.
- No tener vínculos familiares con pacientes con enfermedades autoinmunes.

6.4.2 Criterios de exclusión

- Individuos con proceso infeccioso en curso o diagnóstico de neoplasia.
- Individuos con diagnóstico de diabetes mellitus, artritis reumatoide u otras enfermedades sistémicas.
- individuos que no firmen el consentimiento informado.
- Individuos que se encuentren bajo tratamiento antibiótico de tres meses previos a la toma de las muestras.
- Individuos con aparatología ortodóntica.
- Individuos que hayan tenido terapia periodontal en los últimos 6 meses.
- Individuos en embarazo o lactancia.

6.5 Métodos y técnicas de recolección de información

6.5.1 Evaluación de índices demográficos y clínicos
Edad, sexo, talla, peso, índice de masa corporal (IMC).

6.5.2. Evaluación de parámetros clínicos asociados a inflamación
Evaluación de presencia de articulaciones dolorosas o inflamadas por un médico internista reumatólogo experto. Se tomó sangre venosa para evaluación de marcadores serológicos de inflamación y autoanticuerpos asociados con AR.

6.5.3 Parámetros clínicos periodontales
Evaluación clínica del estado periodontal: A cada individuo se le evaluaron índices clínicos tomados por 2 periodoncistas los cuales participaron en una calibración inter-examinador incluyendo sondaje de la mitad de la boca de dos sujetos en dos oportunidades en la misma semana y se evaluaron con pruebas de concordancia. Antes de iniciar el estudio cada examinador fue entrenado a adecuados niveles de exactitud y reproducibilidad a los parámetros clínicos e índices a ser utilizados.

Se tomaron estos índices en el siguiente orden:

A. Índice Gingival (Loe & Silness 1963) (*Loe & Silness.; 1963*)
B. Índice de Placa
C. Profundidad de la Bolsa
D. Nivel de Inserción
E. Sangrado al Sondaje

De acuerdo a la severidad de la enfermedad los pacientes serán agrupados en dos categorías de acuerdo al promedio del nivel de inserción de los sitios afectados:

A. Periodontitis crónicas leve
B. periodontitis crónica moderada
C. Periodontitis Avanzadas

C. Sanos-Gingivitis

De acuerdo al estado inflamatorio se clasificarán de acuerdo:

A. Al promedio de la profundidad de la bolsa.
B. Total de la boca y promedio de bolsas presentes
C. Al promedio de los sitios con sangrado.

Según la nueva clasificación de la EP se clasificara en:

A. Estadio I
B. Estadio II
C. Estadio III
D. Estadio IV

El diagnóstico y severidad periodontal estará basado según criterios de la academia americana de periodontologia y el CDC *(Eke et al.; 2012*); y la Academia Americana de Periodoncia y Federación Europea de Periodoncia; *(AAP, 2018; Papapanou et al.; 2018*).

6.5.4. Evaluación de la presencia de P. gingivalis por PCR

Se eliminó la placa supragingival y se insertaron puntos de papel absorbente durante los 20 segundos en los seis sitios periodontales más profundos de cada sujeto, como se informó anteriormente. Los cebadores y la sonda utilizados se seleccionaron con la ayuda del programa MegAlign del sistema Lasergene (DNAstar Inc., Madison, Wisconsin, EE. UU.) Para buscar 16S homólogos. Secuencias de ARNr. La amplificación por PCR se realizó en una mezcla de reacción total de 25 µL. Las muestras se amplificaron utilizando lo siguiente: 95 grados centígrados durante 10 minutos seguidos de 45 ciclos a 95 grados centígrados durante 15 segundos y 60 grados centígrados durante un minuto.

Los resultados para muestras de placa desconocidas se proyectaron en una curva estándar generada utilizando P. gingivalis (ATCC 33277), y luego se transformaron en Log10. Se realizó un ensayo

inmunoenzimático indirecto para detectar los anticuerpos IgG1 e IgG2 contra P. gingivalis. Se recubrieron 20 pocillos, a 5 µg por pocillo, con una preparación de cepas completas de ATCC 33277 y W83 de P. gingivalis en solución salina carbonatada con fosfato (PBS; Immuno Concepts Sacramento, California, EE. UU.) Y otros pocillos se recubrieron solo con PBS carbonatado; Las muestras se incubaron durante 16 horas a cuatro grados centígrados. Para la estabilización y el bloqueo previo, 150 µL de solución A, incluido Stabilcoat (SurModics, Eden Prairie, Minnesota, EE. UU.), Cinco por ciento de leche en polvo sin grasa, Avidin (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, California, EE. UU.) ; se añadió albúmina bovina (BSA; Grado de diagnóstico Probumin®, Merck Millipore, Temecula, California, EE. UU.).

Posteriormente, cada pocillo se incubó con 150 µl de solución B, que incluye solo biotina (Vector Laboratories, Inc.) y PBS (Immuno Concepts, Sacramento, California, EE. UU.) ; sin monolaurato de polietilenglicol y sorbitán (Tween 20®, Sigma Aldrich Co, St. Louis, Mo., EE. UU.); Cada incubación se realizó durante una hora a temperatura ambiente (*Romero et al.; 2017*).

Para todas las muestras de suero, se realizaron diluciones en serie de dos en uno de cada 100 con PBS, BSA al 1% y Tween 20® al 0,1%, y se incubaron durante una hora a 37 grados centígrados. Luego, se agregaron 150 µl de IgG1 antihumana (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.) o IgG2 antihumana biotinilada (Sigma-Aldrich, Co, St. Louis, MO, EE. UU.); se diluyeron a uno de cada 4.000 en el mismo tampón solución e incubada en las mismas condiciones (*Romero et al.; 2017*).

A continuación, se agregaron 150 µl de una en 1,500 de estreptavidina de peroxidasa (Invitrogen) a cada pocillo, y las muestras se incubaron durante una hora a 37 grados centígrados. Luego, se añadió O-fenilendiamina (Pierce Laboratories, New Haven, Connecticut, EE. UU.) Diluida en tampón de peróxido (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) Como sustrato. La reacción se completó con ácido sulfúrico (H2 SO4, J.T Baker-, Center Valley, Penn., EE. UU.). Todas las densidades ópticas se midieron a 492 nm, utilizando un filtro de 640 nm como referencia de longitud de onda, con un lector de microplacas Sunrise Tecan (Seestrasse, Männedorf, Suiza) (*Romero et al.; 2017*).

6.5.5 Inmuno-Ensayo indirecto en fase solida (ELISA) para la determinación de anticuerpos IgG1 e IgG2 contra Porphyromonas gingivalis

El siguiente protocolo fue tomado del protocolo desarrollado en el proyecto en curso- Colciencias 545-2011 código. 31734 CT 402. Se realizó un inmunoensayo indirecto en fase solida (ELISA) para la detección de anticuerpos IgG1 e IgG2 contra *P. gingivalis*, para ello, se fijó el antígeno de *P. gingivalis* en placas de ELISA (Ref. 655061 GreinerBio-one) a una concentración de 5 µg/pozo a partir de extractos sonicados de *P. gingivalis* ATCC 33277 y W83 a 4°C durante 16 horas (toda la noche) Además se sensibilizan pozos con PBS (Ref.1011, Inmunoconcepts, EEUU.) con el fin de emplearlos como pozo guía para definir título final (*Bello et al.; 2016*).

Posteriormente se agregó 100 µL/pozo de solución estabilizadora, (SC01-2000 StabilcoatSurModics), a los pozos sensibilizados con *P. gingivalis* durante 2 horas; en seguida, la placa se secó durante 2 horas al exponerse a una corriente de aire a temperatura ambiente; después toda la placa es bloqueada con una solución preparada en PBS 1X Tween (Ref. p1379 Sigma-Aldrich,EEUU) 0.1%, Albúmina sérica bovina (BSA) (Ref.820451, Probumin diagnostic Grade) 1% y leche descremada 1% y 50 µL de Avidina (Ref. SP-2001 Vector Laboratories, INC) por cada mililitro de solución preparada, para adicionar 150µL/pozo a toda la placa; adicionalmente se prepara una solución de PBS 1X Tween 0.1% con 50 µL de Biotina (Ref. SP-2001 Vector Laboratories, INC) por cada mililitro preparado; se sirven 150 µL/pozo con el fin de bloquear sitios inespecíficos.

A los sueros de los sujetos se les realiza una serie de diluciones a partir de 1/100 hasta 1/400 en PBS 1X Tween 0.1% con BSA 1% agregando 100 µL/pozo de la muestra diluida, tanto en el pozo sensibilizado con el sonicado de *P. gingivalis*, como en el de PBS se incuba durante 1 hora a 37°C, luego se adiciona anticuerpos secundarios biotinilados anti-IgG1 (Ref. A10650 Invitrogen, EEUU) y/o anti-IgG2 (Ref. B3398 Sigma-Aldrich, EEUU) en una dilución 1/4000 en solución de PBS 1X Tween 0.1% y BSA 1%, 100 µL/pozo, se incuba durante 1 hora a 37°C (*Bello et al.; 2016*).

Seguido se adiciona 100µL/pozo de Estreptavidina Peroxidasa (Ref. SNN1004, Invitrogen EEUU), en una dilución de 1/1500 100 µL/pozo, y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente luego se prepara una solución del sustrato empleado para revelar la reacción O-Fenilendiamina (OPD) (Ref.34005 Pierce Laboratories), en buffer peróxido 1X (Ref. 34062 Thermoscientific, EEUU). Finalmente, la absorbancia se detecta después de parar la reacción utilizando 2 M de H2SO4 (Ref.

6057 Baker-analized). La lectura se realiza a una longitud de onda de 492 nm con una longitud de onda de referencia de 640nm usando un lector de microplacas (Sunrise™ - Tecan) (*Bello et al.; 2016*).

6.5.6 Marcadores serológicos de inflamación y compromiso articular

6.5.6.1.Medición de PCR ultrasensible: (Immulite 1000, Siemens®, referencia 10286287 High sensitive PCR)

Se realizaron por quimioluminiscencia, esta es definida como la emisión de luz asociada con la disipación de la energía con una sustancia electrónicamente excitada. Si los electrones de un componente luminiscente son estimulados por una luz en estado normal, estos dan energía en forma de luz cuando ellos regresan al estado basal. El resultado final será en mg/L. Considerándose positivo resultados mayores a 3 mg/L (*Unriza et al.; 2017*). (high-sensitivity CRP (hs-CRP) (Immulite 1000, Siemmens® REF. LKCRP1 Erlangen Germany).

6.5.6.2.Medición de la velocidad Globular (VSG)

La determinación de la VSG se realizó por el método de fotometría. Considerándose elevados valores superiores a 20 mm (*Ali- Fax). (Test 1 THL Ali-FAX®Polverara (PD)-Italy*).

6.5.6.3.Medición de Factor Reumatoide IgM

Se midió por técnica de turbidimetría cinética, se detecta la parte de la luz que es residual posterior al choque de ella en una variedad de ángulos. Al suero del paciente se le agregara un anticuerpo dirigido contra el factor reumatoide el cual en caso positivo formará un agregado sobre el cual un láser detectará y generará dispersión de la luz, la cual será cuantificada e informada en UI/mL considerándose positivos resultados superiores a 20 U *(RF TEST, ref. 1107105 Spinreact, Santa Coloma, Spain).*

6.5.6.4 Cuantificación de anticuerpos anti citrulinado

Se utilizó para la medición cuantitativa de IgG/IgA contra péptido citrulinado en suero un sistema ELISA tipo sándwich (*Quanta lite® CCP 3.1 IgG/IgA, INNOVA Diagnosis, San Diego, CA, USA y IMTEC –ITC 60015*).

La molécula a investigar presente en la muestra de suero se une a los anticuerpos absorbidos en la placa; Los anticuerpos unidos al péptido citrulinado reaccionaran con un complejo IgG unido a peroxidasa de rábano, se adiciona el sustrato respectivo y el color es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti CCP o anti RA 33 presenten la muestra. El resultado final será en Unidades ELISA/mL. Considerándose positivo resultados mayores a 20 UI/Ml.

6.5.7. Evaluación de marcadores óseos de la vía WnT

6.5.7.1 Polimorfismos de marcadores óseos, DKK, SOST, LRP5, KREMEN

Extracción de DNA: La extracción del DNA genómico se realizó a partir sangre total anticoagulada con EDTA usando el kit DNA 2000 (Corpogen Corporation, Bogota Colombia) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recolectaron 3 ml de sangre venosa y luego de centrifugar, se tomaron 350 µL de la capa de células blancas, se lavarán 4 veces con 1 mL de solución de lavado para lisar los glóbulos rojos residuales y el botón celular final se homogenizará en 500 µL de buffer de lisis celular. Para desproteinizar esta solución, se adicionaron 500 µL de solución salina, se centrifugó y fue transferido 1 mL de sobrenadante en otro tubo para precipitar el DNA añadiendo 600 µL de isopropanol. El precipitado fue lavado con etanol al 70%, disuelto en 100 µL de solución de reconstitución y almacenado a -20ºC hasta su uso.

Descripción de los SNPs: El alineamiento local para evaluar la localización de los SNPs en los genes, se realizó mediante la herramienta bióinformatica BLAST para nucleótidos disponible en: (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) *(Altschul et al.; 1990).*

La identificación del polimorfismo en la posición del gen para DKK que corresponde a 3 primers para 3 polimorfismos: F (FORWARD, R: REVERSE).

6.5.7.2. Variantes del gen DKK1

Como lo reportado por Rooy et al.; [2014] anteriormente, se tomaron las siguientes variantes: La variante de DKK rs1896367 el cual se encuentra ubicado en el cromosoma 10:52309426, a 4984 pb al lado 3´ del precursor de DKK1, el nucleótido ancestral es G con su complementario C, y su variante es A con su complementario T. La variante para DKK rs1896368 el cual se encuentra localizada en el cromosoma 10:52309144 a 5266 pb al lado 3´del precursor de DKK1, su nucleótido ancestral es A con su complementario T, y su variante es G con su complementario C. Son variantes no codificante en la transcripción o intronicas, pero dada su proximidad al gen DKK1, se le atribuye como variante de este gen (*Rooy et al.; 2014*).

La variante para DKK rs1528873 el cual se encuentra localizada en el cromosoma 10:52342245 a 25413 pb al lado 5´del precursor de DKK, su nucleótido ancestral es T con su complementario A, y su variante es G con su complementario C; es una variante intrónica.

6.5.7.3. Variantes del gen SOST

La variante para el SOST rs4792909 el cual se encuentra ubicado en el cromosoma 17:43721456, a 33844 pb al lado 3´ del precursor de Esclerostina, el nucleótido ancestral es T con su complementario A, y su variante es G con su complementario; variante intrónica. La variante SOST rs6503475 el cual se encuentra ubicado en el cromosoma 17:43733640, a 21677 pb al lado 3´ del precursor de Esclerostina, el nucleótido ancestral es A con su complementario, y su variante es G con su complementario C; variante intrónica.

6.5.7.4 Variante del gen KREMEN-1

La variante para KREMEN rs132274 el cual se encuentra ubicado en el cromosoma 22:29129138, asociado a la proteína Kremen, el nucleótido ancestral es C con su complementario G, y su variante es T con su complemento A; variante intrónica.

6.5.7.5. Variante del gen LRP-5

La variante para LRP5 rs3736228 el cual se encuentra ubicado en el cromosoma 11:68433827, el nucleótido ancestral es C con su complementario G, y su variante es T con su complementario;

variante localizada en el exón del gen, a nivel proteico genera cambio de alanina por una valina en la posición 1330.

La identificación de los polimorfismos se realizó por HRM (high resolution melting) en tiempo real, utilizando cebadores diseñados con el programa Beacon Designer. La PCR HRM se realizó utilizando el kit Precision Melt Supermix (Biorad, Foster city, California USA) utilizando muestras con la secuencia Wild Type como control. La PCR se realizó en una mezcla de reacción de 20µL con 2µM de cada cebador y 50ng de ADN. La generación y comparación de los perfiles de curvas de fusión (melting) se obtuvieron después de la amplificación y se analizaron con el programa HRM de Biorad, (Foster city, California USA). El tamaño del producto se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Proceso de secuenciación: Protocolo de purificación con Acetato-Etanol

6.5.7.6. Análisis de PCR- HRM (high resolution melting)

High resolution Melting o análisis de alta resolución de fusión es una técnica desarrollada recientemente para el análisis post-PCR rápido y de alto rendimiento de mutaciones genéticas o varianza en las secuencias de ácidos nucleicos. Su principio se basa en el análisis de una curva de melting post PCR producida por un incremento de la temperatura cada 0.2°C, de este modo es desnaturalizado gradualmente el ADN blanco amplificado. Emplea un colorante fluorescente que se une específicamente a la doble cadena de ADN, está es usada para monitorear la amplificación durante la PCR y los procesos de fusión post PCR, el colorante genera un incremento en la señal fluorescente una vez unida a la doble cadena de ADN y disminuye la señal fluorescente cuando la doble cadena pasa a una sola hebra de ADN; la tasa más alta de disminución de fluorescencia es generalmente la temperatura de fusión de la muestra de ADN. La Tm se define como la temperatura a la que el 50% de la muestra de ADN es de cadena doble y el 50% es de cadena sencilla. El perfil de fusión depende de la longitud, contenido de GC, secuencia y heterozigosidad del ADN blanco amplificado.

El kit empleado fue Precision Melt Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) Catalog #172-5112: 1000 reacciones x 20 µL), concentración 2X, contiene iTaq™ Polimerasa, dNTPs, $MgCl_2$, Colorante EvaGreen, potenciadores y estabilizadores en una formula optimizada para aplicación de HRM.

- Sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96™ (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).
- Precision Melt Analysis Software ™ (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

Tabla 2. *Primers usados en el estudio (Beacon designer 8 sofware) y variantes del polimorfismo con su ubicación.*

Secuencia	Secuencia 5' a 3'	Variante Ancestral / variante
(DKK) rs1896368	F: GACACCCAGTCTTAGAAA R: AGAATCCTTACACGAGTTA	A/G
(DKK) rs1896367	F: AGTAATAATCATTGACACTGA R: TCCAGGCACTTAATACTT	G/A
(DKK) rs1528873	F: GAGTGGTCAGGAATAAGA R: GCATTGTTAAGGCTATCA	T/G
(SOST475) rs6503475	F: GTGTAATGGTAAGTATAGC R: TTTGTAGCCAGTTGA	A/G
(KREMEN) rs132274	F: CTGACAGCAG R: CTGTATAAATAATCTCTAAAGGTGC	C/T
(LRP5) rs3736228	F: AGGCAGACTGTCAGGACCGCT R: AGGGTCTTGGCAGAGCCTTGA	C/T

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/258640/

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/

6.5.8 Secuenciación de ADN Automatizada

El Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular Instituto de Genética - SSiGMol ofrece servicios de análisis de secuenciación que son rápidos, económicos y confiables. Las muestras son procesadas empleando la química del BigDye Terminator de ABI (el método del dideoxi o Sanger (*Sanger & Coulson, 1975*) y son corridas en un Analizador Genético Applied Biosystems 3500 con capacidad de lectura de secuencia de aproximadamente 1,000 pares de bases. Los equipos utilizados en este proceso son Big Dye Terminator v3.1 Sequencing Kit (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA). Capillary electrophoresis was performed on ABI 3500(LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA).

La secuenciación Sanger utiliza la terminación específica con cuatro fluorocromos diferentes que permite la realización de secuenciación en una reacción.

Para garantizar reproducibilidad y control de calidad, SSiGMol incluye un control positivo que se procesa simultáneamente con las muestras de los usuarios, que garantizan tanto la reacción de secuencia como la calidad de la electroforesis capilar. La muestra de ADN amplificada. El ADN doble es desnaturalizado usando calor. Un primer es añadido al extremo 5' final del ADN. El ADN imprimido está igualmente dividido en 4 tubos de reacción a lo largo de la polimerasa de ADN y todos los cuatro DNTPS (deoxinucleósido trifosfato).

Los DDNTPS diseñados especialmente se agregan a diferentes tubos de reacción. Solamente un tipo de DDNTP (A, T, G O C) se agrega a cada tubo de reacción. La polimerasa de ADN incorpora el DNTPS normalmente a la plantilla de ADN imprimada hasta que se aparee una base de DDNTP. Una vez que la base de DDNTP termina el proceso de elongación se termina debido a la falta de un grupo de 3 hidroxilos en el DDNTP. Esto resulta en la formación de fragmentos con diferentes longitudes. El contenido de cada uno se transfiere en diferentes carriles de un gel de poliacrilamida y sujeto a la electroforesis de gel. Esos resultados en la formación de los patrones de banda a través del gel que puede interpretarse como la secuencia de la muestra de ADN.

En el campo de la genómica funcional, la secuenciación de ADN ha permitido a los científicos identificar secuencias de nucleótidos que codifican proteínas diferentes.

El campo de la genómica comparativa se ha beneficiado enormemente de este descubrimiento; La secuenciación del ADN ha permitido a los investigadores comparar el genoma de diferentes organismos y estudiar su grado de relación genética. La secuenciación de ADN también ha ayudado a los científicos y médicos a estudiar trastornos genéticos complejos e identificar diferencias genéticas entre pacientes.

7. PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

7.1 Hipótesis de estudio

A. Existen diferencias entre las frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos de genes asociados a la vía de Wnt en individuos sistémicamente sanos con y sin enfermedad periodontal.
B. Las frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos de genes asociados a la vía de Wnt en individuos sistémicamente sanos se asocian con variables inmunológicas y clínicas periodontales.

7.2 Hipótesis nula

No existen diferencia entre las frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos de genes asociados a la vía de Wnt en individuos sistémicamente sanos con y sin enfermedad periodontal.

7.3 Hipótesis alterna

Si existen diferencia entre las frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos de genes asociados a la vía de Wnt en individuos sistémicamente sanos con y sin enfermedad periodontal.

7.4 Estadística descriptiva y analítica

Se utilizó el paquete estadístico STATA para Windows, donde se procesó inicialmente haciendo análisis exploratorio de datos con métodos gráficos, distribuciones de frecuencia y se evaluaron los supuestos estadísticos para determinar las pruebas no paramétricas o paramétricas, para así escoger el método estadístico con indicadores pertinentes: para el caso paramétrico a nivel comparativo distribución de chi- cuadrado, y para los valores *P* ajustados se utilizara test de fisher, y en el caso no paramétrico la prueba de U de Mann–Whitney y kruskal Wallis.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

8.1 Consentimiento informado

El proyecto conforme con los principios éticos para las investigaciones en seres humanos comprendido en la Declaración de Helsinki, reglamentada en Colombia por el Ministerio de Salud a través de la resolución 8430 de 1993, posee un riesgo mínimo que estará sujeto a todo lo dispuesto en la resolución. Esta investigación tuvo en cuenta los artículos a los que hace alusión dicha resolución en el capítulo I de los aspectos éticos de la investigación en humanos y por las características del estudio que lo clasifica como riesgo mínimo, todo participante firmó un consentimiento informado antes de iniciar el estudio. Adicionalmente, las muestras que se tomaron para procesamiento en los individuos no implicaron ningún riesgo para los participantes ya que corresponden a exámenes rutinarios que no generan riesgo adicional. Las muestras fueron tomadas por personal totalmente entrenado y el total de sangre a extraer está dentro del rango que determina este capítulo para su clasificación como riesgo mínimo. Aprobación comité de ética Institucional HMC, 047,2015.

9. RESULTADOS

9.1 Fase descriptiva

9.1.1 Parámetros clínicos y demográficos

Se analizaron 157 individuos, sistémicamente sanos con una media de edad de 41.1 ±13.08; distribuidos en 73.9% (116) mujeres, y 26.1% (41) hombres. El 34.3% presentaron alguna comorbilidad, siendo la más frecuente la hipertensión arterial en un 18.5%, seguido de artrosis en un 16.6% e hipotiroidismo en un 12.9 %.En la población de estudio se analizó el IMC con una mediana de 24 (22-25,9), de los cuales el 65.6 % de los pacientes presentaron un IMC normal, el 28.7% presentaron sobrepeso y el 5.7% presentaron obesidad. Se analizaron características sociodemográficas de los individuos como el estado civil, actividad económica, tipo de vivienda y el nivel educativo, donde solo el 42.68% presentaban un nivel universitario. Solo el 10.19% de los sujetos se registró como fumadores activos y el 89.81% no fumaban. Del total de individuos 21.6% reportaron ser fumadores pasivos y 26.7% exposición al tabaco (tabla 3).

Tabla 3. *Descripción de variables socio demográfica y clínica de la población de estudio*

	CONTROLES n=157
Edad[⇧]	
promedio DS	*41,1± 13,08*
Genero[§]	
Femenino	*116 (73,9)*
Masculino	*41 (26,1)*
Actividad economica[□]	
Hogar	*24 (15,2)*
Independiente	*8 (5,1)*
Empleado	*103 (65,6)*
Pensionado	*8 (5,1)*
Estudiante	*14 (8,9)*
Tipo de vivienda[ʒ]	
Propia	*91 (57,9)*
Arrendada	*48 (30,5)*
Común	*17 (10,8)*
Alojamiento	*1 (0,6)*
Estado civil[Ω]	
Casado	*53 (33,7)*
Soltero	*58 (36,9)*
Viudo	*5 (3,1)*
Unión Libre	*31 (19,7)*
Separado	*10 (6,3)*
Nivel educativo[α]	
Primaria	*15 (9,5)*
Bachillerato	*38 (24,2)*
Técnico	*37 (23,5)*
Universitario	*67 (42,6)*
Comorbilidad[ɯ]	
Presenta	*54 (34,3)*
Ausencia	*103 (65,6)*
IMC°	
Mediana- Min-Max	*24 (22-25,9)*
IMCTOTAL[^]	
Normal	*103 (65,6)*
Sobrepeso	*45 (28,7)*
Obesidad	*9 (5,7)*
IMC25[ɛ]	
Normal	*103 (65,6)*
Sobrepeso / Obesidad	*54 (34,4)*
IMC30[ʔ]	
Normal/sobrepeso	*148 (94,3)*
Obesidad	*9 (5,7)*
fumador activo[•]	
Si	*16 (10,1)*
No	*141 (89,8)*
fumador pasivo[ʎ]	
Si	*34 (21,6)*
No	*123 (78,3)*
Exposición al tabaco[‡]	
Si	*42 (26,7)*
No	*115 (73, 2)*

Edad[⇧] *(media±DS),, Genero*[§] *(n (%)), Comorbilidad*[ɯ] *(n (%)),Estado civil*[Ω] *(n (%)), Nivel educativo*[α] *(n (%)), tipo de vivienda*[ʒ] *(n (%)), actividad economica*[□] *(n (%)), fumador activo*[•] *(n (%)), fumador pasivo*[ʎ] *(n (%)), Exposición al tabaco*[‡] *(n (%)),Índice de masa corporal , IMC*[ʏ] *(mediana, (RIQ)), IMCTOTAL*[^] *n(%),IMC25*[ɛ] *n(%),IMC30*[ʔ] *n(%)*

9.1.2 Variables serológicas asociadas a inflamación sistémica

Se analizó para cada individuo cada índice serológicos de la actividad inflamatoria. El 16.56% de los sujetos presentaron una VSG mayor a 20mm/cm ^{3} y el 83.44 % presentaron VSG en rangos normales (< 20mm/cm ^{3}), con una mediana de 6 mm/ cm^3 (2-13). El 69,43% de la muestra presentó un nivel de PCR positivo alto y el 24,20% un nivel positivo, considerándose niveles superiores a 3 mg/L valores elevados, y un 69.43% presento una PCR inferior a este límite de corte; con una mediana de 1,6 mg/L (0,5-3,7) del total de la población estudiada. EL 92.36% de los individuos presentaron niveles considerados negativos para el FR, 7.01% fueron positivos para este indicador (superiores a 20U) y un 0.64% que corresponde a 1 paciente con nivel positivo alto de FR (mayores a 60U), con una media para la población total de 11.80± 14.35 U. El análisis clínico de articulaciones dolorosas e inflamadas reportó una mediana de 0 (0-0) para ambos índices respectivamente. El 92.99% de los sujetos presentaron niveles de ANTI-CCP menores de 20 UI/ml considerados negativos (tabla 4).

Tabla 4. *Descripción de variables serológicas en la población de estudio*

	CONTROLES n=157
VSG[ψ]	
Mediana- Max-Min	***6 (2-13)***
VSG[Ω] F%	
≤20	***131 (83,44)***
>20	***26 (16,56)***
PCR[µ]	
Mediana – Max-Min	***1,6 (0,5-3,7)***
PCR[ρ]	
Negativo	***109 (69,43)***
Positivo	***38 (24,20)***
Positivo alto	***109 (69,43)***
FR[ε]	
Promedio DS	***11,80± 14,35***
FR[τ]	
Negativo	***145 (92,36)***
Positivo	***11 (7,01)***
Positivo alto	***1 (0,64)***
Articulación dolorosa[•]	
Mediana- Max-Min	***0(0-0)***
Articulación Dolorosa[ξ]	
ninguna	***122 (77,77)***
>1	***35 (22,3)***
Articulación inflamada[ε]	
Mediana- Max-Min	***0(0-0)***
Articulación inflamada[ϟ]	
ninguna	***147 (93,63)***
>1	***10 (6,37)***
Anti -CCP[ϑ]	
<20	***146 (92,99)***
20-39	***9 (5,73)***
40-59	***1 (0,64)***
>60	***1 (0,64)***

VSG[ψ] (mediana (RIQ) velocidad de sedimentación globular), ; VSG[Ω] n(%); PCR[ρ] (mediana (RIQ) proteína C reactiva); PCR[§] n(%); FR[ε] (media±Ds) (factor reumatoide); FR[τ] n(%); Articulación dolorosa[•] (mediana (RIQ)); Articulación Dolorosa[ξ] n(%);Articulación inflamada[ε] (mediana (RIQ)); Articulación inflamada[ϟ] n(%); Anticuerpos Antipeptidos Citrulinados; Anti -CCP[ϑ] n(%).

9.1.3 Descripción de la frecuencia de polimorfismos únicos SNPs en la población estudias

Las frecuencias de SNPs en la población estudiada fueron las siguientes: el 55, 41% presentó el SNPs de DKK 367, siendo el 46,5% heterocigotos. El 80,25% presentó el SNPs de DKK 368, siendo el 45,22% heterocigoto en cuanto a la población general estudiada.

El 48,41% presento el SNPs de DKK 873, siendo el 45,86% heterocigoto, en cuanto a la población general estudiada.

El 72, 61% presento el SNPs de KREMEN, siendo el 42,06% heterocigoto, y el 69,43% para el SNPs de SOST 475, siendo el 51,59% heterocigoto, de la población general estudiada (tabla 5).30 individuos que corresponden al 19,1% del total de la población estudiada presentaron los 3 SNPs para DKK 367, 368 Y 873, en combinación con el SNPs de KREMEN. 21 individuos que corresponden al 13,3% del total de la población estudiada presentaron todos los SNPs (tabla 5).

2 (1,27%) individuos presentaron agrupación de SNPs DKK367 y DKK368. 2 (1,27%), presentaron agrupación de SNPs para las tres isoformas de DKK 367, 368 y 873, sin ningún otro SNPs adicional. 9 (5,7%) de la totalidad de la población estudiada, presentó las tres SNPs de DKK y el SNPs de KREMEN; y 21 pacientes que corresponde al 13,3% de la totalidad de la población estudiada presentaron SNPs para DKK, KREMEN y SOST 475. Se encontró también que el SNPs de DKK367 y KREMEN se da acompañado de SOST 475. 6 pacientes que corresponden al 3,8%, presentaron solo el SNPs de DKK 368 (tabla 5).

Para LRP5 se encontró que el 21% presentaban el SNP, siendo el 5% homocigoto, y el 15,9% heterocigoto.

Tabla 5. *Descripción de frecuencia de SNPs en la población de estudio*

	CONTROLES n=157(%)
DKK 367A	
No tiene polimorfismo	***70 (44,59)***
Tiene polimorfismo	***87 (55,41)***
DKK 367A	
Nativo	***70 (44,59)***
Polimorfismo homocigoto	***14 (8,92)***
Polimorfismo heterocigoto	***73 (46,5)***
DKK 368Ig	
No tiene polimorfismo	***31 (19,75)***
Tiene polimorfismo	***126 (80,25)***
DKK 368Ig	
Nativo	***31 (19,75)***
Polimorfismo homocigoto	***55 (35,03)***
Polimorfismo heterocigoto	***71 (45,22)***
DKK 873T	
No tiene polimorfismo	***81 (59,51)***
Tiene polimorfismo	***76 (48,41)***
DKK 873T	
Nativo	***81 (59,51)***
Polimorfismo homocigoto	***4 (2,55)***
Polimorfismo heterocigoto	***72 (45,86)***
KREMEN1	
No tiene polimorfismo	***43 (27,39)***
Tiene polimorfismo	***114 (72, 61)***
KREMEN1	
Nativo	***43 (27,39)***
Polimorfismo homocigoto	***48 (30,57)***
Polimorfismo heterocigoto	***66 (42,04)***
SOST 475A	
No tiene polimorfismo	***48 (30,57)***
Tiene polimorfismo	***109 (69,43)***
SOST 475A	
Nativo	***48 (30,57)***
Polimorfismo homocigoto	***28 (17,83)***
Polimorfismo heterocigoto	***81 (51,59)***
LRP5T	
No tiene polimorfismo	***124(78,9%)***
Tiene polimorfismo	***33(21%)***

LRP5[T]	
Nativo	***124(78,9%)***
Polimorfismo homocigoto	***8(5%)***
Polimorfismo heterocigoto	***25(15,9%)***

DKK 367 [k]n(%);DKK 367[c] n(%);DKK 368[g] n(%);DKK 368[a] n(%);DKK 873[¥] n(%);DKK 873[i] n(%);KREMEN[•] n(%);KREMEN[e] n(%);SOST 475[ð] n(%);SOST 475[ι] n(%),LRP5[T] n(%).

9.1.4 Parámetros de diagnóstico periodontal e índices periodontales

De 157 individuos evaluados periodontalmente, sistémicamente sanos, el 57.3% presentaron diagnóstico de EP, de los cuales el 8.9% presentaba una severidad leve, el 38,9% moderada y el 9,6% severa, mientras que el 42,7% de la población total estudiada no tuvieron diagnóstico de periodontitis, según la clasificación del CDC. Del 57,3% de los pacientes diagnosticados con periodontitis, el 8,9 % presentó estadio I de periodontitis, el 35,6% estadio II, el 12,7% estadio III y el 1,2% estadio IV (figura 2).

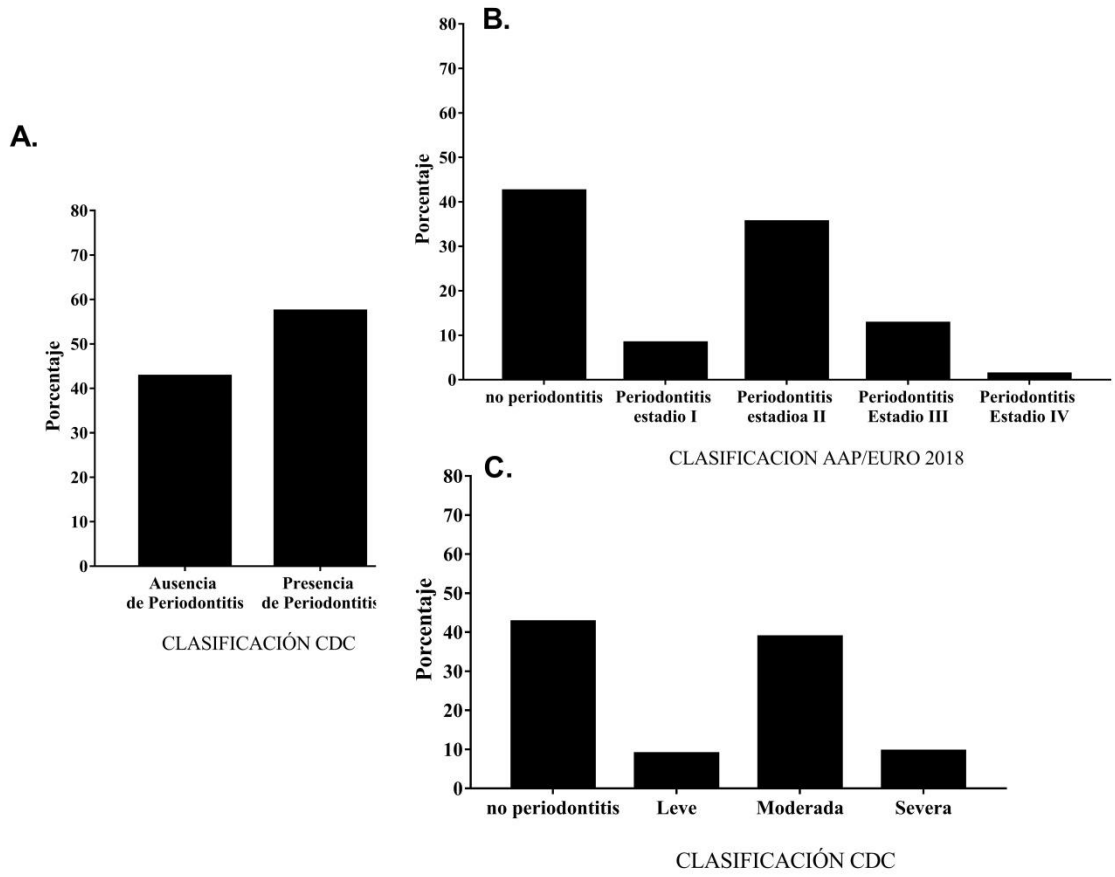


Figura 2 Distribución de porcentaje de pacientes según el diagnóstico periodontal; (A), muestra el porcentaje de pacientes con ausencia y presencia de periodontitis según la clasificación para diagnóstico y severidad periodontal basado según criterios de la academia americana de periodoncia y el CDC. (B), porcentaje de pacientes sin periodontitis y con periodontitis, distribuidos en los diferentes estadios clasificados según la Academia Americana de Periodoncia, AAP y Federación Europea de Periodoncia, EURO . (C), porcentaje de pacientes sin periodontitis y con periodontitis, distribuidos según la severidad de la enfermedad.

9.1.5 Descripción de variables de diagnóstico periodontal en la población estudiada

El 57.3% de la totalidad de la población estudiada presentaron diagnóstico de EP, donde el 9,6% presentaba EP severa. Para el diagnóstico de EP según los estadios, el 35,6% presentó estadio II, seguido por un 12,7% con un estadio III. De la población total estudiada el 38,85% presentaron anticuerpos contra *P.gingivalis,* de tipo inmunoglobulina IgG1, y el 36,94% presentaron IgG2. El 45,51% presentó *P. gingivalis, P.g* en placa subgingival y el 54,49%% fue negativo para este indicador (tabla 6).

Tabla 6. *Descripción de variables de diagnóstico periodontal en la población de estudio*

	CONTRLES
	n= 157
DX periodontal[ξ]	
Ausencia	*67 (42,7)*
Presencia	*90 (57,3)*
Severidad[•]	
Ninguna	*67 (42,6)*
leve	*14 (8,9)*
moderada	*61 (38,9)*
severa	*15 (9,6)*
DX periodontal con la nueva clasificación: caso de periodontitis[Ω]	
No periodontitis	*67 (42,6)*
Estadio I	*13 (8,9)*
Estadio II	*56 (35,6)*
Estadio III	*20 (12,7)*
Estadio IV	*2 (1,2)*
Titulos Acs IgG1 Pg[⇑]	
Ausencia	*96 (61,15%)*
presenta	*61 (38,85%)*
Titulos Acs IgG2 Pg[§]	
Ausencia	*99 (63,06%)*
presenta	*58 (36,94%)*
PG[µ]	
Negativo	*85 (54,49%)*
Positivo	*71 (45,51%)*
Pg Log10[ψ]	
Negativo	*97 (62,18%)*
Positivo	*59 (37,82%)*

Diagnostico periodontal; DX periodontal[ξ] n(%),Severidad[•] n(%),DX periodontal con la nueva clasificación n(%), Acs; Anticuerpos; P. gingivalis; IgG; Inmunoglobulinas tipo G[⇑]; n(%),Títulos Acs IgG2 Pg[§] n(%),PG[µ] P.gingivalis n(%),Pg Log10[ψ] n(%).

9.1.6 Descripción de variables clínicas de diagnóstico periodontal

El 80,89% de los pacientes presento más de 20 dientes en boca, con una mediana de 24 (13-49). En el índice de placa IP, se encontró que el 47,13% de los pacientes presentó un IP mayor al 50%, el 30,57% presento un IP entre el 30 al 50 %, y un 30,57% un IP menor de 30%; con una mediana de 45 (27-71). El sangrado al sondaje tuvo una mediana de 35 (20-54). Donde el 44,59% de los pacientes presentó menos del 30% de los sitios evaluados presentaba sangrado al sondaje (tabla 7). La presencia de sitios con bolsa periodontales tuvo una mediana de 1,59 (0-5,3) y el nivel de inserción de informo con una mediana de 0,99 (0,39-1,86) para el total de la población estudiada.

La mediana para los sitios con bolsas periodontales de 4 a 5 mm fue de 2 (0-6), para las bolsas de 5 mm o más fue de 0 (0 – 2). La mediana para los sitios con pérdida de nivel de inserción CAL en la población estudiada fue de 156 (132 - 168); distribuidas en las categorías de CAL ≥2mm con una mediana de 41 (15 - 68); CAL ≥3mm con una mediana de 19 (4 - 35); CAL ≥4mm con una mediana de 4 (0 - 12), CAL ≥5mm con una mediana de 1 (0 - 5), CAL ≥6mm con una mediana de 0 (0 - 1) (tabla 7).

Tabla 7. *Descripción de variables periodontales la población de estudio*

VARIABLES		CONTROLES n=157
Numero de Dientes§		26 (22 - 28)
Numero de dientes¥	0-10	9 (5,73%)
	10,1 - 20	21 (13,38%)
	>20	127 (80,89%)
Índice de placa§		45 (27 - 71)
Índice de placa %¥	0-30	48 (30,57%)
	30-50	35 (22,29%)
	>50	74 (47,13%)
Índice gingival§		24 (13 - 49)
Índice gingival %¥	0-30	90 (57,32%)
	30-50	28 (17,83%)
	>50	39 (24,84%)
Sangrado al sondaje§		35 (20 - 54)
Sangrado al sondaje %¥	0-30	70 (44,59%)
	30-50	43 (27,39%)
	>50	44 (28,03%)
Supuración§		0 (0-0)
% Sitios Bolsa§		1,59 (0 - 5,33)
CAL§		0,99 (0,39 - 1,86)
Porcentaje general de bolsa§		2,1 (1,89 - 2,36)
Sitios con CAL ≥2§		0,33 (0,11 - 0,57)
Sitios total evaluados con bolsa§		156 (132 - 168)
Bolsas de 4-5 §		2 (0 - 6)
Porcentaje de bolsas de 4 a 5 §		0,01 (0 - 0,04)
Bolsas de 5 o mas§		0 (0 - 2)
Porcentaje de bolsas de 5 o mas§		0 (0 - 0,01)
Bolsa inicial de Sitios Evaluados§		104 (88 - 112)
Bolsa inicial afectado §		2 (0 - 6)
Bolsa Promedio§		4 (0 - 4,3)
Bolsa Porcentaje§		0,02 (0 - 0,07)
CAL TOTAL §		156 (132 - 168)
CAL 2 o Mayor §		41 (15 - 68)

Porcentaje de CAL de 2 o mayor [§]	0,31 (0,1 - 0,56)
CAL de 3 o mayor [§]	19 (4 - 35)
Porcentaje de CAL de 3 o mayor [§]	0,14 (0,02 - 0,3)
CAL de 4 o mayor [§]	4 (0 - 12)
Porcentaje de CAL de 4 o mayor[§]	0,02 (0 - 0,13)
CAL de 5 o mayor[§]	1 (0 - 5)
Porcentaje de CAL de 5 o mayor [§]	0,01 (0 - 0,04)
CAL de 6 o mayor [§]	0 (0 - 1)
Porcentaje de CAL de 6 o mayor[§]	0 (0 - 0,01)
Sitios evaluados para CAL interproximal[§]	104 (88 - 112)
Valores de CAL[§]	76 (25 - 135)
CAL interproximal de sitios evaluados[§]	34 (12 - 56)
Porcentaje de CAL interproximal[§]	2,18 (1,73 - 2,7)
Porcentaje de CAL interproximal [§]	0,41 (0,15 - 0,7)

[ϑ= (media ±ds), [§]= (mediana, (RIQ), n(%),[ж] =(media ±ds), Índice de placa[ł] (mediana, (RIQ)), CAL[ж] perdida de inserción clínica (media ±ds).

9.2 Fase analítica

9.2.1 Comparación de las parámetros sociodemográficos y clínicos demográficas entre los individuos sanos según el diagnóstico periodontal

Se analizaron 157 individuos, divididos en dos grupos según el diagnóstico periodontal por CDC. 67 individuos con ausencia de EP y 90 individuos con presencia de EP. Se encontró diferencias significativas entre las medias de edad para cada grupo, siendo 36,3 ± 12,8 para el grupo sin EP y 44,6 ± 12,1 para el grupo con EP, con un valor *p* significativo, (*p=0,00)*. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la presencia de comorbilidades en ambos grupos, sin embargo, de los 90 pacientes con diagnóstico de EP el 40% presentaba alguna comorbilidad, sin un valor *p* significativo, (*p>0,05)* ; siendo más frecuente la de hipertensión arterial en un 18.51%, seguido de artrosis en un 16.66% e hipotiroidismo en un 12.96 %. En cuanto a consumo de cigarrillo, antecedente de consumo de cigarrillo, y exposición pasiva al tabaco, no se encontraron diferencias significativas (*p>0,05),* (tabla 8).

En cuanto al IMC se reportó mayor para el grupo con EP que corresponde a 24,5, en comparación con el grupo sin EP. Para el IMC total y el IMC ajustado a 25 no se

encontraron diferencias significativas (tabla 7). En el grupo de 90 individuos con diagnóstico de EP se encontró que un 8,9% presento un IMC de 30 o mayor; con valor *p* significativo entre los grupos, (*p=0,04)* (tabla 8).

Tabla 8. *Comparación de parámetros sociodemográficas y clínicos según el diagnóstico periodontal*

	AUSENCIA EP n=67	***PRESENCIA EP n=90***	***Valor p***
Edad[⇑]			
promedio DS	*36,3 ± 12,8*	*44,6 ± 12,1*	*0,00**
Genero[§]			
Femenino	*50 (74,6%)*	*66 (73.3%)*	*0,855*
Masculino	*17 (25,4%)*	*24 (26,7%)*	
Comorbilidad[µ] *(%)*			
Presenta	*18(26,9%)*	*36(40%)*	*0,08*
Ausencia	*49(73,1%)*	*54(60%)*	
IMC°			
mediana	*23,7*	*24,5*	*0,01**
Percentil25- percentil75	*21,2 – 25,4*	*22,6 – 26,9*	
IMCTOTAL[^] *(%)*			
Normal	*48(71,6%)*	*55(61,1%)*	*0,11*
Sobrepeso	*18(26,9)*	*27(30%)*	
Obesidad	*1(1,5%)*	*8(8,9%)*	
IMC25[ε] *(%)*			
Normal	*48(71,6%)*	*55(61,1%)*	*0,11*
Sobrepeso / Obesidad	*19(28,4%)*	*35(38,9%)*	
IMC30[∂] *(%)*			
Normal/sobrepeso	*66(98,5%)*	*82(91,1%)*	*0,04**
Obesidad	*1(1,5%)*	*8(8,9%)*	
fumador activo[•] *(%)*			
Si	*8(11,9%)*	*8(8,9%)*	*0,35*
No	*59(88,1%)*	*82(91,1%)*	
fumador pasivo[(%) ϰ]			
Si	*16(23,9%)*	*18(20%)*	*0,56*
No	*51(76,1%)*	*72(80%)*	
Exposición al tabaco[(%) ∃]			
Si	*18(26,9%)*	*24(26,7%)*	*0,56*
No	*49(73,1%)*	*66(73,3%)*	

Chi2: IMC[ƒ]*, índice de masa corporal n (%), comorbilidad n(%), fuma n(%), fumo n(%), exposición al tabaco (fumador pasivo) n(%), valor p * significante (p<0,05)*
U de Mann-Whitney: Edad[⇑]*(media ± ds), IMC° (mediana, percentil 25- percentil 75).*

9.2.2 Comparación de las variables serológicas y articulares entre los individuos según el diagnóstico periodontal

En el análisis no se encontró diferencia en cuanto a las medianas de la VSG, entre los grupos (*p= 0,28);* sin embargo el 20% de los individuos con EP presentaban una VSG >20mm/cm ^{3}, en comparación con un 11,9% de los individuos sin EP que presentaron una VSG >20mm/cm ^{3}, sin un valor *p* significativo, (*p>0,05)* (tabla 9).

En cuanto a la PCR, no se encontraron diferencias significativas. El factor reumatoide FR, no presento diferencias significativas al ser analizado para ambos grupos; sin embargo el 8,9% de los individuos del grupo con EP presentaban un FR positivo, en comparación con un 4,5% del grupo sin EP. En cuanto a la presencia de articulaciones dolorosas e inflamadas, no se presentó diferencias significativas, (*p>0,05)* (tabla 9). La presencia de ANTI-CCP con un punto de corte de 20 UI/ml no presentó diferencia estadística (tabla 9). Para las variables serológicas asociadas y articulares los grupos son comparables entre sí.

Tabla 9. *Comparación de variables serológicas según el diagnóstico periodontal*

	AUSENCIA EP n=67	***PRESENCIA EP n=90***	***Valor p***
VSG			
Mediana	*23,7*	***24,5***	***0,28***
Percentil25-percentil75	*21,2 – 25,4*	***22,6 – 26,9***	
VSG F%			
≤20	*59(88,1%)*	***72(80%)***	***0,12***
>20	*8(11,9%)*	***18(20%)***	
PCR			
Mediana	*1,43*	*1,6*	*0,44*
Percentil25 – percentil75	*0,3 – 3,7*	***0,7 – 3,5***	
PCR			
Negativo	*45(67,2%)*	***64(71,1%)***	***0,79***
Positivo	*18(26,9%)*	***20(22,2%)***	
Positivo alto	*4(6%)*	***6(6,7%)***	
FR			
Mediana	*10*	*10*	*0,30*
Percentil25 – percentil75	*10 - 10*	***10 - 10***	
FR			
Negativo	*64(95,5%)*	***81(90%)***	***0,42***
Positivo	*3(4,5%)*	***8(8,9%)***	
Positivo alto	*0(0%)*	***1(1,1%)***	
Articulación dolorosa			

Mediana	*0*	*0*	*0,58*
Percentil25 – percentil75	*0*	***0***	
Articulación Dolorosa[¥]			
ninguna	*53(79,1%)*	***69(76,7%)***	***0,43***
>1	*14(20,9%)*	***21(23,3%)***	
Articulación inflamada[ɕ]			
Mediana	*0*	*0*	*0,80*
Percentil25 – percentil75	*0*	***0***	
Articulación inflamada[ϐ]			
ninguna	*63(94%)*	***84(93,3%)***	***0,56***
>1	*4(6%)*	***6(6,7%)***	
Anti -CCP[ϑ]			
Mediana	*7,8*	***7,8***	***0,16***
Percentil25 – percentil75	*7,8 – 7,8*	***7,8 – 7,8***	

Chi2: VGS[⇑] Velocidad de sedimentación globular n(%),PCR[ϐ] proteína C reactiva n(%),FR[ᵠ] factor reumatoide n(%),Art. Dol[¥] articulaciones dolorosas n(%),Art. Infl[ϑ] articulaciones inflamadas n(%), U de Mann-Whitney: VSG[⇑](mediana, percentil25 – percentil75); PCR[ω] (mediana, percentil25 – percentil75); FR[ɕ](mediana, percentil25 – percentil75); Articulación dolorosa[¥], Articulación inflamada[ɕ], Anti -CCP[ϑ](mediana, percentil25 – percentil75)

9.2.3 Comparación de las variables periodontales entre el grupo con EP y el grupo sin EP

Las variables periodontales analizadas en la población, se encontraron diferencias significativas entre los grupos, presentándose los índices más altos en la población con EP en comparación con la población sin EP. Con la excepción del número de dientes entre los grupos donde no se obtuvo un valor *p* significativo; así como para la cantidad de sitios evaluados para el índice bolsa periodontal y los sitios evaluados para CAL, los cuales tampoco tuvieron diferencias entre los grupos.

9.2.4 Comparación de las frecuencias de SNPs entre el grupo de EP y sin EP

Se analizaron las frecuencias de los polimorfismos únicos SNPs para cada grupo, tanto para el grupo con EP como el grupo sin EP. Se encontró que el 67,2% de los individuos sin EP presentaban el SNPs para DKK 367, con un valor *p= 0,008* (figura 3)*;* siendo el 58,2% heterocigoto; con un valor *p* significativo al compararlo con el grupo con EP; un valor *p= 0,027*. Se encontró que el 85,6% de los individuos con EP presentaban SNPs

para DKK 368; con un valor *p* significativo; (*p= 0,042)* (figura 4), siendo el 46,6% heterocigoto y el 38,9% homocigoto; en comparación con un 73,1% de los individuos sin EP que presentaban el SNPs. Para el análisis de DKK 873, no se encontraron diferencias entre los grupos. Para KREMEN se encontró que el 82,1% de los individuos sin EP presentaron el SNPs, con un valor (*p= 0,016)* (figura 5), distribuidos en un 43,3% que presentaban el SNPs heterocigoto y el 38,8% homocigoto; en comparación con un 24,4% de individuos con EP que presentaban en SNPs, con un valor *p* significativo *(p=0,040)*. En cuanto al SNPs para SOST 475 y LRP5 228 no se encontraron diferencias entre los grupos.

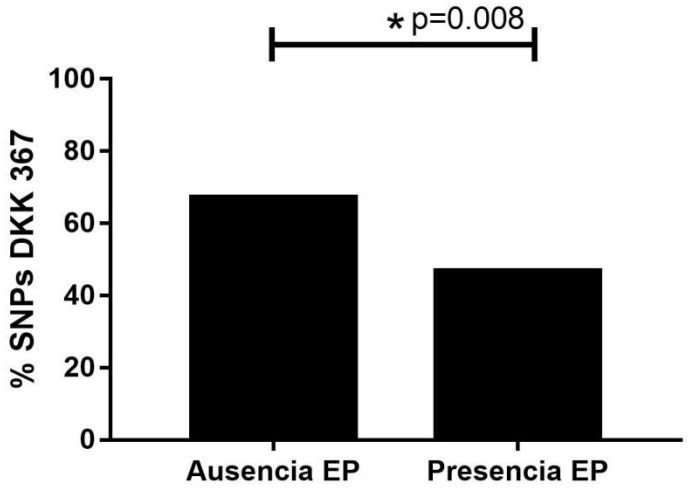


Figura 3. Porcentaje de individuos con presencia de polimorfismos de un solo nucleótido SNP DKK 367 con ausencia y presencia de EP.

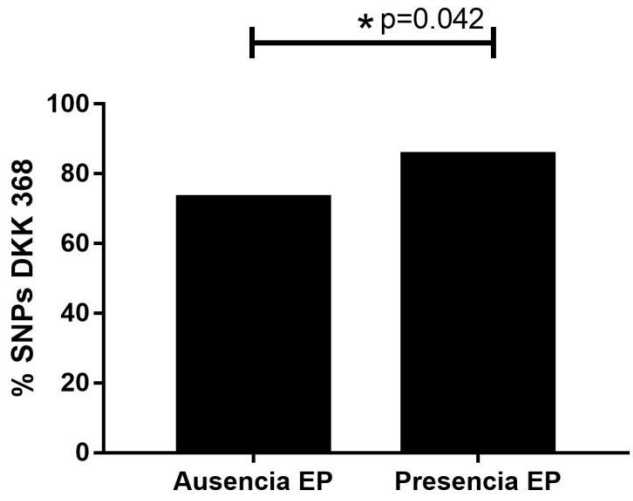


Figura 4. Porcentaje de individuos con presencia de polimorfismo de un solo nucleótido SNP DKK 368, con ausencia y presencia de EP.

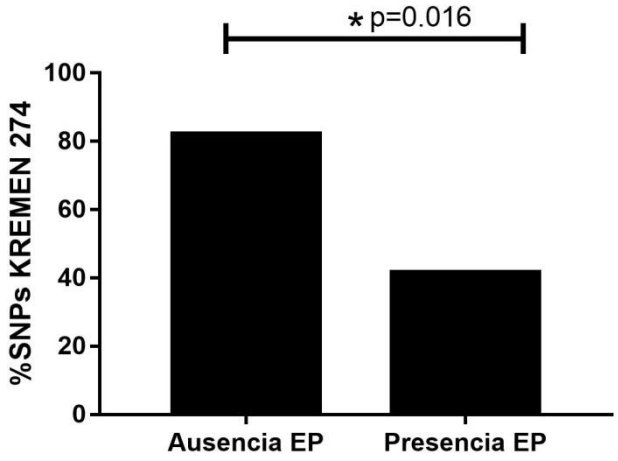


Figura 5. Porcentaje de individuos con presencia de polimorfismo de un solo nucleótido SNP KREMEN 274, con ausencia y presencia de EP

9.2.5 Análisis de frecuencias de SNPs en individuos con EP según la severidad.

Al evaluar la frecuencia de SNPs con la severidad en los individuos que presentaron diagnóstico de EP, se obtuvo que 67 individuos sin EP, 14 individuos con EP leve, 61 individuos EP moderada y 15 individuos EP severa. Se observó que la frecuencia de individuos más alta se encontraba en

el grupo que no tenía diagnóstico de EP que correspondía a 45 individuos (67,2%), sin embargo de los individuos que presentaron una severidad leve de EP, que correspondían a 10 individuos (71,4%), tenían presencia del SNP DKK 367; siendo así un total de 55 (63,2%) individuos con ausencia de EP o EP leve con mayor frecuencia de presencia de este SNP; a diferencia de 32 (42,1%) individuos con diagnóstico de EP moderada o severa que presentaron este SNP (figura 6).

Se encontró que 25 individuos (41%) presentaron una severidad moderada; siendo menor esta frecuencia en comparación con el grupo con ausencia de DKK 367, se mostró un valor p significativo, que indica que las frecuencias más altas para la severidad moderada y severa de la EP presentan el SNP DKK 367, sin embargo para la EP leve se mostró los contrario, en el grupo de 90 individuos con diagnóstico de EP. Se mostraron diferencias significativas en la forma del SNP presentado para DKK 367, siendo en el grupo con diagnóstico de EP severa 0% SNP homocigoto, y 7 individuos (46,7%) heterocigoto, para EP moderada 36 individuos (59%) presento el genotipo nativo, para EP leve se mostró que 8 individuos (57,1%) presentaron el SNP heterocigoto; sin embargo la frecuencia mayor de este SNP se presentó en el grupo sin EP, siendo 39 individuos (58,2%) SNP heterocigoto y 22 (32,8%) con genotipo nativo, con un valor *p* significativo. Sin embargo, ninguno de los individuos presento DKK 367 solo, 7 individuos con EP severa presentaron DKK 367 y DKK 368, más KREMEN y SOST 475.

La totalidad de los individuos con EP severa, que correspondía a 15 pacientes (100%), presentaron el SNP para DKK 368, con un valor *p* significativo *(p=0,040)*; a diferencia de 59 individuos (72,8%) con ausencia de EP o presencia de EP leve (figura 7). Al igual 52 individuos (82,2%) con EP moderada presentaron SNP para DKK 368, las frecuencias más altas de la población con diagnóstico de EP presentaron este SNPS, con valor *p* significativo *(p=0,040)*. Sin embargo no se presentaron diferencias entre los grupos en cuanto a forma de SNP DKK 368, aunque no hubo individuos con DKK 368 homocigoto en el grupo de EP severa, siendo la frecuencia más alta heterocigoto (tabla 10).

No se presentaron diferencias significativas en cuanto a DKK 873, SOST 475 y LRP5 entre los grupos. La frecuencia más alta de KREMEN se presentó en el grupo sin EP, 55 (82%) individuos sin EP presentaron este SNP; a diferencia de 45 (60%) individuos con diagnóstico de EP leve o moderada, con un valor *p* significativo *(p=0,005)* (figura 8). sin embargo, para los individuos con diagnóstico de EP, el 93,3% de individuos con EP severa, el 60,7% de individuos con EP moderada

y el 57,1% de los pacientes con EP leve, presentaron el SNP para KREMEN, con mayor frecuencia de SNP heterocigoto en el grupo de EP severa (60%) y moderada (39,3%), con un valor *p* significativo (tabla 10). Al realizar el análisis por haplotipo no se encontró ninguna diferencia estadística para el parámetro de severidad (tabla 11).

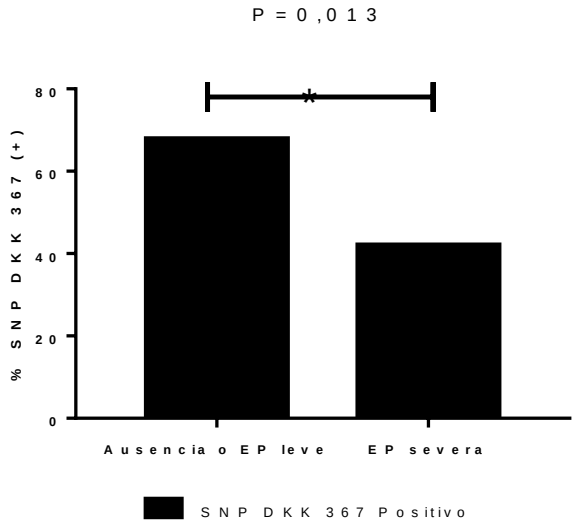


Figura 6. Análisis de frecuencias de SNP DKK 367 en individuos con EP según la severidad

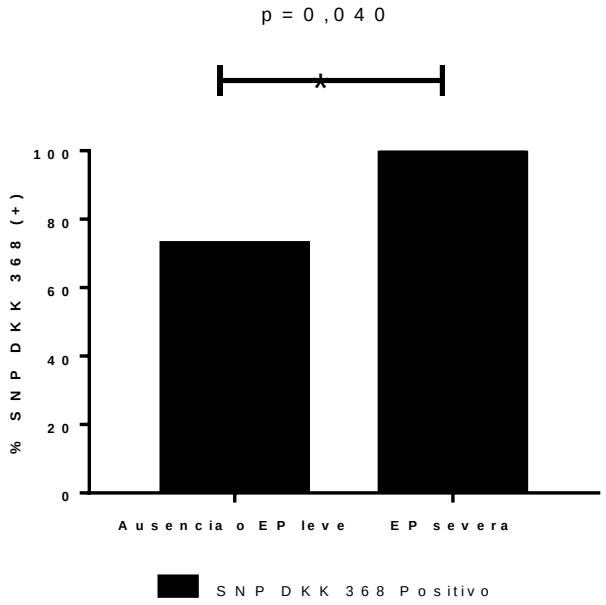


Figura 7. Análisis de frecuencias de SNP DKK 368 en individuos con EP según la severidad

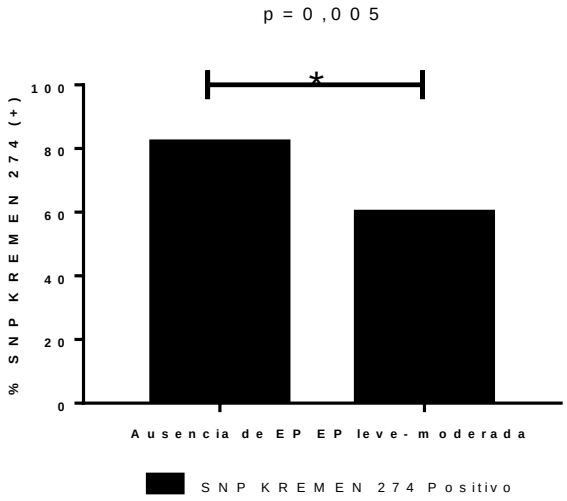


Figura 8. Análisis de frecuencias de SNP KREMEN 274 en individuos con EP según la severidad

Tabla 10. *Descripción de frecuencias de polimorfismos genéticos en individuos con enfermedad periodontal según la severidad*

		Severidad de la enfermedad periodontal				
		Ausencia	**Leve**	**Moderada**	**Severa**	
		N (%)	**N (%)**	**N (%)**	**N (%)**	***Valor p***
DKK367	Ausencia	22 (32,8%)	4 (28,6%)	36 (59,0%)	8 (53,3%)	*0,013**
	Presencia	45 (67,2%)	10 (71,4%)	25 (41,0%)	7 (46,7%)	
DKK367	Nativo	22 (32,8%)	4 (28,6%)	36 (59,0%)	8 (53,3%)	
	Polimorfismo homocigoto	6 (9,0%)	2 (14,3%)	6 (9,8%)	0 (0,0%)	*0,039**
	Polimorfismo heterocigoto	39 (58,2%)	8 (57,1%)	19 (31,1%)	7 (46,7%)	
DKK368	Ausencia	18 (26,9%)	4 (28,6%)	9 (14,8%)	0 (0,0%)	*0,040**
	Presencia	49 (73,1%)	10 (71,4%)	52 (85,2%)	15 (100,0%)	
DKK368	Nativo	18 (26,9%)	4 (28,6%)	9 (14,8%)	0 (0,0%)	
	Polimorfismo homocigoto	20 (29,9%)	3 (21,4%)	24 (39,3%)	8 (53,3%)	*0,135*
	Polimorfismo heterocigoto	29 (43,3%)	7 (50,0%)	28 (45,9%)	7 (46,7%)	
KREMEN	Ausencia	12 (17,9%)	6 (42,9%)	24 (39,3%)	1 (6,7%)	*0,005**
	Presencia	55 (82,1%)	8 (57,1%)	37 (60,7%)	14 (93,3%)	
KREMEN	Nativo	12 (17,9%)	6 (42,9%)	24 (39,3%)	1 (6,7%)	
	Polimorfismo homocigoto	26 (38,8%)	4 (28,6%)	13 (21,3%)	5 (33,3%)	*0,025**
	Polimorfismo heterocigoto	29 (43,3%)	4 (28,6%)	24 (39,3%)	9 (60,0%)	

** p <0,05*

Tabla 11. *Descripción de frecuencias de haplotipos de SNPs en individuos con enfermedad periodontal según la severidad*

		Severidad de la enfermedad periodontal				
		Ausencia N (%)	**Leve** N (%)	**Moderada** N (%)	**Severa** N (%)	***Valor p***
KREMEN / DKK367	Ausencia	64 (95,5%)	14 (100,0%)	59 (96,7%)	15 (100,0%)	0,725
	Presencia	3 (4,5%)	0 (0,0%)	2 (3,3%)	0 (0,0%)	
DKK368	Ausencia	67 (100,0%)	13 (92,9%)	57 (93,4%)	14 (93,3%)	0,179
	Presencia	0 (0,0%)	1 (7,1%)	4 (6,6%)	1 (6,7%)	

9.2.6 Análisis de frecuencias de SNPs en individuos con EP según la nueva clasificación de la AAP.

Al evaluar las frecuencias de SNPs con los estadios de diagnóstico de EP de AAP de 2018, se obtuvo 13 individuos con EP estadio I, 55 individuos con EP estadio II, 20 individuos con EP estadio III y 2 individuos con EP estadio IV.

Se encontró que 45 (67,2%) no presentó diagnóstico de EP; 9 (69,2%) presentó diagnóstico de EP estadio I; 22 (40%) individuos presentaron diagnóstico de EP estadio II; 9 (45%) individuos presentaron diagnóstico de EP estadio III Y 2 (100%) individuos presentaron diagnóstico de EP estadio IV; con un valor *p* significativo *(P=0,011)* (figura 9) (tabla 12).

Se encontró que 49 (73,1%) no presentó diagnóstico de EP; 9 (69,2%) presentó diagnóstico de EP estadio I; 46 (83,6%) individuos presentaron diagnóstico de EP estadio II; 20 (100%) individuos presentaron diagnóstico de EP estadio III Y 2 (100%) individuos presentaron diagnóstico de EP estadio IV; con un valor *p* significativo *(P=0,034)* (figura 10) (tabla 12).

Se encontró que 55 (82,1%) no presentó diagnóstico de EP; 8 (61,5%) presentó diagnóstico de EP estadio I; 34 (61,8%) individuos presentaron diagnóstico de EP estadio II; 16 (80%) individuos presentaron diagnóstico de EP estadio III Y 1 (50%) individuos presentaron diagnóstico de EP estadio IV; con un valor *p* significativo *(P=0,059)* (figura 11) (tabla 12).

Al realizar el análisis de los estadios de EP, con DKK 873, LRP5 y SOST 475, no se encontraron diferencias significativas.

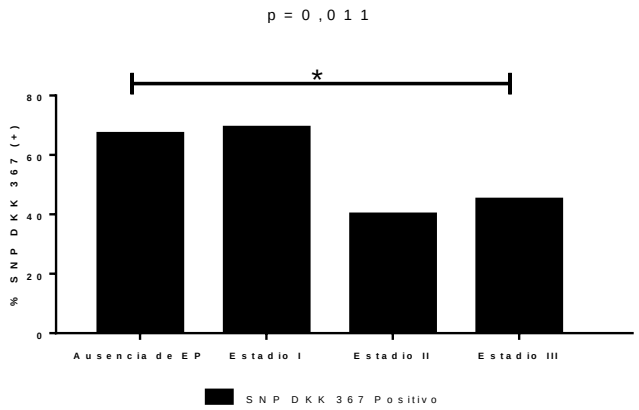


Figura 9. Análisis de frecuencias de SNP DKK 367 en individuos con EP según la nueva clasificación de la AAP.

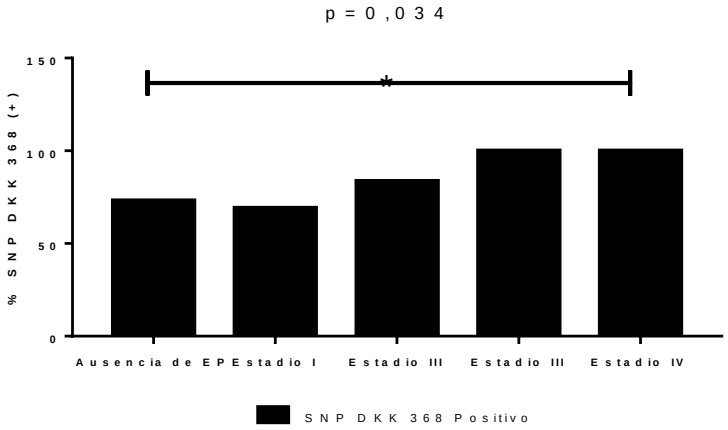


Figura 10. Análisis de frecuencias de SNP DKK 368 en individuos con EP según la nueva clasificación de la AAP.

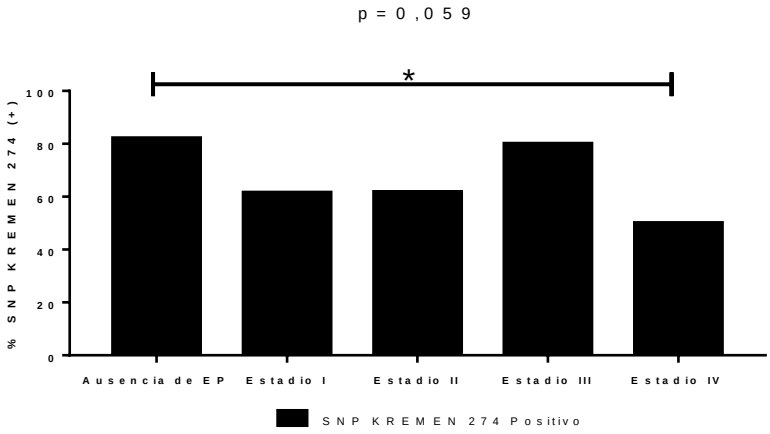


Figura 11. Análisis de frecuencias de SNP KREMEN 274 en individuos con EP según la nueva clasificación de la AAP.

Tabla 12. *Descripción de frecuencias de SNPs en individuos con enfermedad periodontal según la nueva clasificación de la AAP.*

		Diagnostico periodontal					
		Ausencia N (%)	**Estadio I N (%)**	**Estadio II N (%)**	**Estadio III N (%)**	**Estadio IV N (%)**	***Valor p***
DKK367	Ausencia	22 (32,8%)	4 (30,8%)	33 (60,0%)	11 (55,0%)	0 (0,0%)	**0,011***
	Presencia	45 (67,2%)	9 (69,2%)	22 (40,0%)	9 (45,0%)	2 (100,0%)	
DKK367	Nativo	22 (32,8%)	4 (30,8%)	33 (60,0%)	11 (55,0%)	0 (0,0%)	
	Polimorfismo homocigoto	6 (9,0%)	2 (15,4%)	6 (10,9%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	**0,018***
	Polimorfismo heterocigoto	39 (58,2%)	7 (53,8%)	16 (29,1%)	9 (45,0%)	2 (100,0%)	
DKK368	Ausencia	18 (26,9%)	4 (30,8%)	9 (16,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	**0,034***
	Presencia	49 (73,1%)	9 (69,2%)	46 (83,6%)	20 (100,0%)	2 (100,0%)	
DKK368	Nativo	18 (26,9%)	4 (30,8%)	9 (16,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
	Polimorfismo homocigoto	20 (29,9%)	3 (23,1%)	21 (38,2%)	11 (55,0%)	0 (0,0%)	**0,082**
	Polimorfismo heterocigoto	29 (43,3%)	6 (46,2%)	25 (45,5%)	9 (45,0%)	2 (100,0%)	
KREMEN	Ausencia	12 (17,9%)	5 (38,5%)	21 (38,2%)	4 (20,0%)	1 (50,0%)	**0,059***
	Presencia	55 (82,1%)	8 (61,5%)	34 (61,8%)	16 (80,0%)	1 (50,0%)	
KREMEN	Nativo	12 (17,9%)	5 (38,5%)	21 (38,2%)	4 (20,0%)	1 (50,0%)	
	Polimorfismo homocigoto	26 (38,8%)	4 (30,8%)	11 (20,0%)	7 (35,0%)	0 (0,0%)	**0,224**
	Polimorfismo heterocigoto	29 (43,3%)	4 (30,8%)	23 (41,8%)	9 (45,0%)	1 (50,0%)	
	Presencia	16(23,9%)	2(14,3%)	13(21,3%)	2(13,3%)	0(0%)	

** p <0,05*

9.2.7 Descripción de las frecuencias de SNPs asociados EP severa

Al evaluar las frecuencias de los SNP, se encontró que 142 individuos se encontraban en la categoría de ausencia / EP leve/ EP moderada, y solo 15 individuos presentaban EP severa. Se observó que 7 (46,7%) de los 15 individuos con EP severa presentaban el SNP de DKK 367, sin embargo no se encontró un valor *p* significativo, para presencia o ausencia ni para condición homocigótica o heterocigótica, sin embargo ninguno de los individuos con EP severa presento el SNP homocigoto.

Se observó que los 15 (100%) individuos presento SNP de DKK 368, con un valor *p* significativo, (figura 12), sin embrago solo 1 (6,7%) individuo presento el SNP DKK 368 sin ningún otro SNP. No se encontraron diferencia significativas entre las formas de presentación del SNP DKK 368, sin embargo ninguno de los individuos con EP severa presento genotipo nativo, el 53,3% presento SNP homocigoto y el 26,7% heterocigoto, con un valor p no significativo (tabla 13). No se encontraron diferencias significativas en los SNP DKK 873 y SOST 475.

Igualmente 14 (93,3%) individuos con EP severa presentaron el SNP de KREMEN, todos estos individuos presentaron también DKK 368, con un valor p significativo. Sin embargo no se encontraron diferencias en la forma de presentación del SNP, aunque el 60% de los individuos con EP severa que presentaron este SNP eran heterocigóticos, sin un valor p significativo (tabla 13). No se encontraron diferencias significativas entre la presencia o ausencia de SNP, con el consumo activo de tabaco, historia de consumo de tabaco y exposición al cigarrillo

Tabla 13. *Descripción de las frecuencias de SNPs asociados enfermedad periodontal severa*

		Enfermedad periodontal severa		*Valor p*
		Ausencia/ Leve / Moderada N (%)	**Severa N (%)**	
DKK367	Ausencia	62 (43,7%)	8 (53,3%)	0,474
	Presencia	80 (56,3%)	7 (46,7%)	
DKK367	Nativo	62 (43,7%)	8 (53,3%)	
	Polimorfismo homocigoto	14 (9,9%)	0 (0,0%)	0,414
	Polimorfismo heterocigoto	66 (46,5%)	7 (46,7%)	
DKK368	Ausencia	31 (21,8%)	0 (0,0%)	0,031*
	Presencia	111 (78,2%)	15 (100,0%)	
DKK368	Nativo	31 (21,8%)	0 (0,0%)	
	Polimorfismo homocigoto	47 (33,1%)	8 (53,3%)	0,062
	Polimorfismo heterocigoto	64 (45,1%)	7 (46,7%)	
KREMEN	Ausencia	42 (29,6%)	1 (6,7%)	0,047*
	Presencia	100 (70,4%)	14 (93,3%)	
KREMEN	Nativo	42 (29,6%)	1 (6,7%)	
	Polimorfismo homocigoto	43 (30,3%)	5 (33,3%)	0,141
	Polimorfismo heterocigoto	57 (40,1%)	9 (60,0%)	

**** p <0,05***

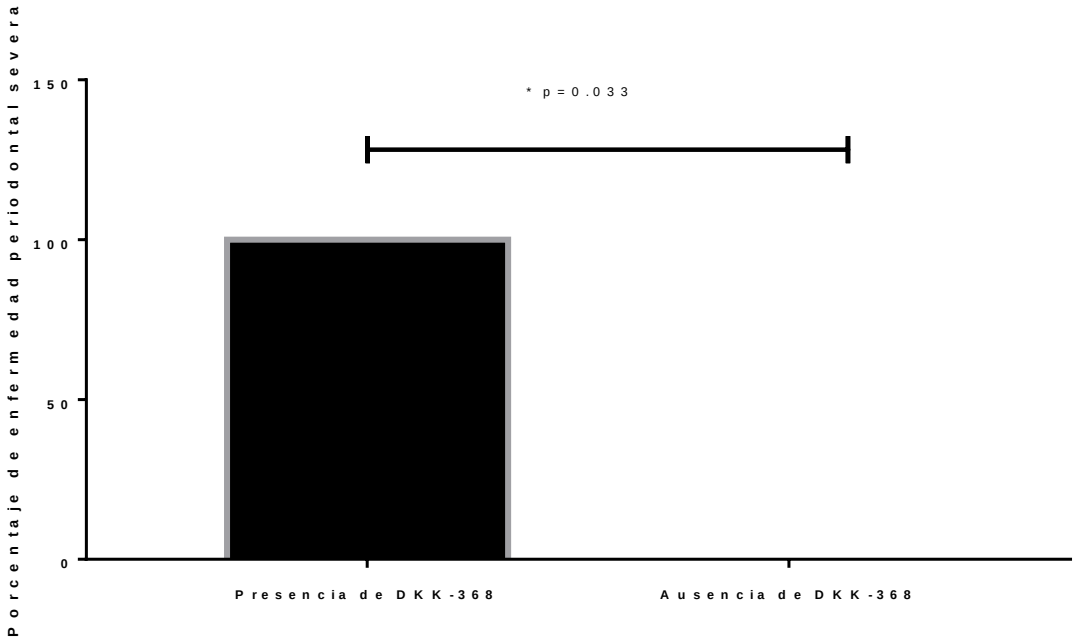


Figura 12. Porcentaje de individuos con diagnóstico de EP severa con presencia o ausencia de SNP para DKK 368, independiente de la presencia o no de otro SNP. % de severidad clasificado según el CDC

9.2.8 Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP DKK rs1896367 y parámetros de diagnóstico periodontal

Al realizar el análisis de las frecuencias genotípicas del SNP rs1896367 con los parámetros de diagnóstico periodontal, se encontró que los individuos que no presentaban este SNP presentaban una mediana de sitios con CAL mayor o igual a 4 mm que correspondía a 5,44 (0,69-15,38); la cual fue mayor que la encontrada en los individuos que presentaban este SNP, donde se encontró una mediana de sitios con CAL mayor o igual a 4 mm de 1,67(0,00-7,89), con un valor *p* significativo *(p=0,021).* Igualmente, se encontró que los individuos que no presentaron el SNP presentaban una mediana de sitios con CAL igual o mayor a 5 mm de 0,82 (0,00-5,07); la cual fue mayor que la encontrada en los individuos que presentaban el SNP, con un valor *p* significativo *(p=0,012)* (tabla 14). En cuanto a los otros parámetros periodontales evaluados no se encontraron diferencias significativas entre los individuos que presentaron y los que no presentaron este SNP (tabla 14).

Tabla 14. *Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP DKK rs1896367 y parámetros periodontales*

	SNP DKK rs1896367						
	No presenta el SNP			**Presenta el SNP**			
	Mediana	**Percentil 25**	**Percentil 75**	**Mediana**	**Percentil 25**	**Percentil 75**	**Valor *p***
Numero de Dientes	26,00	23,00	28,00	27,00	21,00	28,00	0,884
% Índice de placa	43,50	23,00	65,00	52,00	29,00	75,00	0,288
% Índice gingival	22,00	10,00	41,00	27,00	14,00	54,00	0,203
% Sangrado al sondaje	32,00	18,00	49,00	38,00	21,00	58,00	0,351
% Bolsa periodontal 4 a 5 mm	1,40	0,00	3,57	1,33	0,00	3,57	0,852
% Bolsa periodontal ≥ 5 mm	0,00	0,00	1,23	0,00	0,00	1,19	0,969
% Bolsa Total	1,79	0,00	5,56	1,85	0,00	7,50	0,803
% CAL ≥ 2mm	34,42	10,12	58,33	25,49	8,93	54,63	0,184
% CAL ≥ 3mm	17,56	5,36	34,06	11,11	1,19	28,95	0,104
% CAL ≥ 4mm	5,44	0,69	15,38	1,67	0,00	7,89	0,021*
% CAL ≥ 5mm	0,82	0,00	5,07	0,00	0,00	2,47	0,012*
% CAL ≥ 6mm	0,00	0,00	1,45	0,00	0,00	0,60	0,127
% CAL Total	42,19	15,18	70,00	40,74	10,71	72,00	0,623

** p <0,05*

9.2.9 Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP DKK rs1896368 y parámetros de diagnóstico periodontal

Al realizar el análisis de las frecuencias genotípicas del SNP rs1896368 con los parámetros de diagnóstico periodontal, se encontró que los individuos que presentaban este SNP presentaban una mediana de sitios con CAL mayor o igual a 2 mm que correspondía a 33,33 (11,73-56,94); la cual fue mayor a la encontrada en los individuos que no presentaban este SNP, donde se encontró una mediana de sitios con CAL mayor o igual a 2 mm de 22,92 (5,36-52,67), con un valor *p* significativo *(p=0,048).* Igualmente, se encontró que los individuos que presentaron el SNP presentaban una mediana de sitios con CAL igual o mayor a 3 mm de 16,67 (4,17-32,62); la cual fue mayor que la encontrada en los individuos que no presentaban el SNP que correspondía a 4,17 (0,00-19,33), con un valor *p* significativo *(p=0,003)* (tabla 15). De la misma manera, encontramos que los individuos que presentaban este SNP, tenían una mediana de sitios con CAL igual o mayor a 5 mm de 0,62 (0,00-4,86); la cual tuvo una diferencia significativa con la encontrada en los individuos que no presentaban este SNP, con un valor *p* significativo *(p=0,019).* Igualmente; para el parámetro CAL mayor o igual a 4 mm se encontró que los individuos que presentaban este SNP, presentaban una mediana de 3,77 (0,56-14,04); la cual fue mayor a la encontrada en los individuos que no presentaban el SNP con un valor *p* significativo *(p=0,003).* En cuanto a los otros parámetros periodontales evaluados no se encontraron diferencias significativas entre los individuos que presentaron y los que no presentaron este SNP (tabla 15).

Tabla 15. *Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP DKK rs1896368 y parámetros periodontales*

	DKK rs1896368						
	No presenta el SNP			**Presenta el SNP**			
	Mediana	**Percentil 25**	**Percentil 75**	**Mediana**	**Percentil 25**	**Percentil 75**	**Valor *p***
Numero de Dientes	28,00	24,00	28,00	25,50	21,00	28,00	0,120
% Índice de placa	54,00	33,00	75,00	44,00	26,00	71,00	0,562
% Índice gingival	24,00	14,00	57,00	25,50	11,00	48,00	0,876
% Sangrado al sondaje	36,00	26,00	68,00	34,50	18,00	54,00	0,379
% Bolsa periodontal 4 a 5 mm	1,85	0,00	4,00	1,19	0,00	3,57	0,543
% Bolsa periodontal ≥ 5 mm	0,00	0,00	1,19	0,00	0,00	1,23	0,757
% Bolsa Total	3,13	0,00	6,25	1,79	0,00	7,00	0,689
% CAL ≥ 2mm	22,92	5,36	52,67	33,33	11,73	56,94	0,048*

% CAL ≥ 3mm	4,17	0,00	19,33	16,67	4,17	32,62	0,003*
% CAL ≥ 4mm	0,00	0,00	5,33	3,77	0,56	14,04	0,003*
% CAL ≥ 5mm	0,00	0,00	1,33	0,62	0,00	4,86	0,019*
% CAL ≥ 6mm	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,42	0,115
% CAL Total	23,28	8,04	60,29	41,67	16,67	72,00	0,141

** p <0,05*

9.2.10 Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP DKK rs1528873 y parámetros de diagnóstico periodontal

Al realizar el análisis de las frecuencias genotípicas del SNP DKK rs1528873, con los parámetros periodontales evaluados, no se encontraron resultados significativos entre presentan o no presentar el SNP.

9.2.11 Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP KREMEN rs132274 y parámetros de diagnóstico periodontal

Al realizar el análisis de las frecuencias genotípicas del SNP rs132274 con los parámetros de diagnóstico periodontal, se encontró que los individuos que no presentaban este SNP presentaban una mediana de número de dientes presentes de 24 (18-28); la cual fue menor a la encontrada en los individuos que presentaban este SNP, donde se encontró una mediana de 27 (23-28), con un valor *p* significativo *(p=0,005).* Al analizar el parámetro CAL, se encontró que los individuos que no presentaban el SNP, presentaban una mediana de sitios con CAL mayor o igual a 2 mm de 38,33 (11,11-66,67); la cual fue mayor a la encontrada en los individuos que presentaban el SNP que correspondía a 25,78 (8,02-52,08) para este parámetro, con un valor *p* significativo *(p=0,042)* (tabla 16).

Igualmente, se encontró que los individuos que no presentaron el SNP presentaban una mediana de CAL total de 57,14 (32,50-83,04); la cual fue mayor que la encontrada en los individuos que presentaban el SNP que correspondía a 36,24 (9,82-63,39), con un valor *p* significativo *(p=0,003)* (tabla 16). En cuanto a los otros parámetros periodontales evaluados no se encontraron diferencias significativas entre los individuos que presentaron y los que no presentaron este SNP (tabla 16).

Tabla 16. *Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP KREMEN rs132274 y parámetros periodontales*

	KREMEN rs132274						
	No presenta el SNP			Presenta el SNP			
	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Valor *p*
Numero de Dientes	24,00	18,00	28,00	27,00	23,00	28,00	0,005*
% Índice de placa	49,00	18,00	66,00	45,00	30,00	75,00	0,391
% Índice gingival	21,00	3,00	42,00	27,00	13,00	52,00	0,184
% Sangrado al sondaje	33,00	22,00	48,00	36,00	18,00	54,00	0,923
% Bolsa periodontal 4 a 5 mm	1,08	0,00	3,62	1,40	0,00	3,57	0,625
% Bolsa periodontal ≥ 5 mm	0,00	0,00	0,60	0,00	0,00	1,33	0,384
% Bolsa Total	1,79	0,00	5,56	1,93	0,00	7,03	0,595
% CAL ≥ 2mm	38,33	11,11	66,67	25,78	8,02	52,08	0,042*
% CAL ≥ 3mm	17,26	4,17	40,15	11,22	1,19	29,49	0,114
% CAL ≥ 4mm	5,33	0,00	16,67	2,33	0,00	11,90	0,163
% CAL ≥ 5mm	0,76	0,00	5,91	0,00	0,00	4,17	0,223
% CAL ≥ 6mm	0,00	0,00	1,08	0,00	0,00	0,88	0,376
% CAL Total	57,14	32,50	83,04	36,24	9,82	63,39	0,003*

** p <0,05*

9.2.12 Análisis de las frecuencias genotípicas del SNP SOST rs6503475 y parámetros de diagnóstico periodontal

Al realizar el análisis de las frecuencias genotípicas del SNP SOST rs6503475, con los parámetros periodontales evaluados, no se encontraron resultados significativos entre presentan o no presentar el SNP.

9.2.13 Frecuencias alélicas para los SNPs

DKK rs1896367: Se encontraron frecuencias alélicas que correspondían a de 314 alelos en la población de 157 individuos incluidos, 213 alelos, los cuales representan el 0,67 (67,83%), correspondían al alelo ancestral C, mientras que 101 alelos, los cuales representan el 0,32 (32,16%), correspondían a la variante T, siendo homocigotos o heterocigotos.

DKK rs1896368: De los 314 alelos en la población de 157 individuos estudiados se encontró 133 alelos, que representan el 0,43 (42,35%), para el alelo ancestral T, y 181 alelos, que representan el 0,57 (57,64%), para la variante C.

DKK rs1528873: De los 314 alelos en la población de 157 individuos estudiados se encontró 234, que corresponden a un 0,74 (74,52%), presentan el alelo ancestral A, y 80, que corresponde a un 0,25 (25,47%), se presenta el alelo variante C.

KREMEN rs132274: De los 314 alelos en la población de 157 individuos estudiados se encontró 152, que corresponden a un 0,48 (48,40%), presentan el alelo ancestral C; y 173, que corresponden al 0,55 (55,09%) de los alelos, presentaban la variante T.

SOST rs6503475: De los 314 alelos en la población de 157 individuos estudiados, se encontró 177 alelos que corresponden a 0,56 (56,36%) son alelo ancestral A, y 137 alelos que corresponden al 0,44 (43,63%) son la variante G.

LRP rs3736228: De los 314 alelos en la población de 157 individuos estudiados, se encontró 248 alelos que corresponde a 0,7898 (78,98%) son alelo ancestral C, y 66 alelos que corresponden al 0,2101 (21,01%) que corresponden al alelo variante T.

9.2.14 Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896367 y su asociación con el diagnóstico periodontal.

Al realizar el análisis de las frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896367 con relación al diagnóstico periodontal y parámetros periodontales, se encontró que de los 314 alelos en nuestra población estudiada, 50 (49,5%) presentaron alelo de la variante A, se encontraban en individuos con diagnóstico de EP; a diferencia de 130 (61%) alelos ancestrales G encontrados en el grupo de individuos sin EP; con un valor p =0,054 (tabla 17). No se encontraron diferencias en los parámetros clínicos articulares como articulaciones dolorosas e inflamadas. Igualmente, no se encontraron diferencias entre los dos alelos analizados, ancestral G y variante A; en cuanto a la presencia de *P. gingivalis* y la presencia de títulos de anticuerpos IgG 1 contra *P. gingivalis* (tabla 17).

Sin embargo, en cuanto al análisis de la presencia de títulos de anticuerpos IgG 2 contra *P. gingivalis* se encontró que la ausencia de estos anticuerpos se relacionaban con la presencia del

alelo variante con una frecuencia de 71,3%, con un valor *p* significativo (*p= 0,037)*(tabla 17). Igualmente, se encontró que en el grupo de individuos con estadio I de EP, se presentaron 15 (7%) alelos ancestrales G, a diferencia de 11 (10,9%) alelos de la variante A; en el grupo de individuos con estadio II de EP se presentaron 82 (38,5%) alelos ancestrales G; a diferencia de 28 (27,7%) alelos de la variante A; en cuantos a los individuos que presentaron estadio III de EP, se encontró 31 (14,6%) alelos ancestrales G; a diferencia 9 (8,9%) alelos de la variante A encontrados en este mismo grupo. Por último, en el grupo que presento estadio IV de EP, se encontraron 2 (0,9%) alelos ancestrales G y 2 (2%) alelos de la variante A; con un valor *p=0,094* (tabla 17). La presencia de alelo variante A para DKK rs1896367 se asocia con la ausencia de EP *(p=0,050).*

En cuanto al análisis de la severidad de EP, se encontró una tendencia en el grupo de individuos que presento EP severa donde se encontraron 23 (10,8%) alelos ancestrales G, a diferencia de 7 (7%) alelos de la variante A, lo que llevaría a pensar que tener el alelo ancestral está relacionado con la presencia y severidad de la EP (tabla 17).

Tabla 17. *Análisis de frecuencias alélicas de DKK rs1896367 y diagnóstico periodontal*

		DKK rs1896367				
		Ancestral		**Variante**		
		n	**% de N**	**n**	**% de N**	**Valor *p***
Diagnostico periodontal	Ausencia	83	39,0%	51	50,5%	0,054
	Presencia	130	61,0%	50	49,5%	
P.gingivalis	Negativo	115	54,0%	55	54,5%	0,901
	Positivo	97	45,5%	45	44,6%	
Articulación dolorosa	Ausencia	167	78,4%	77	76,2%	0,667
	Presencia	46	21,6%	24	23,8%	
Articulación inflamada	Ausencia	198	93,0%	96	95,0%	0,478
	Presencia	15	7,0%	5	5,0%	
Anticuerpos IgG1.Pg	Ausencia	125	58,7%	67	66,3%	0,194
	Presencia	88	41,3%	34	33,7%	
Anticuerpos IgG2.Pg	Ausencia	126	59,2%	72	71,3%	0,037*
	Presencia	87	40,8%	29	28,7%	
***P.gingivalis* Log10**	Ausencia	134	62,9%	60	59,4%	0,586
	Presencia	78	36,6%	40	39,6%	

Diagnostico periodontal nueva clasificación	Ausencia	83	39,0%	51	50,5%	0,094
	Estadio I	15	7,0%	11	10,9%	
	Estadio II	82	38,5%	28	27,7%	
	Estadio III	31	14,6%	9	8,9%	
	Estadio IV	2	0,9%	2	2,0%	
Severidad de Enfermedad periodontal	Ausente	83	39,0%	51	50,5%	0,065
	Leve	16	7,5%	12	11,8%	
	Moderada	91	42,7%	31	30,7%	
	Severa	23	10,8%	7	7%	

** p <0,05*

9.2.15 Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896368 y su asociación con el diagnostico periodontal

Al analizar las frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896368 con relación al diagnóstico periodontal y parámetros periodontales, se encontró que de los 314 alelos analizados de nuestra población, 112 (61,9%) de alelos de la variante G, se presentaron en individuos con diagnóstico de EP; a diferencia de 68 (51,1%) alelos ancestrales A qué se encontraron en individuos sin EP; este resultado no mostro diferencias estadísticas para ninguno de loa alelos evaluados (tabla 18). Igualmente, para los parámetros clínicos articulares, articulaciones dolorosas e inflamadas, no se encontró diferencia para los alelos evaluados; así como para los parámetros periodontales como títulos de anticuerpos contra *P. gingivalis*.

En cuanto al diagnóstico de EP teniendo en cuenta la nueva clasificación se encontró que el 12 (6,6%) de los alelo de la variante G, se presentaron en individuos con estadio I de EP; a comparación de 14 (10,5%) de los alelos ancestrales A encontrado en este mismo grupo. Igualmente, se encontró que los individuos con estadio II de EP presentaron 43 (32,2%) alelos ancestrales A, a diferencia de 67 (37%) alelos de la variante G encontrados en este mismo grupo. Igualmente se encontró que en los individuos que presentaron estadio III de EP, se encontró 9(6,8%) alelos ancestrales A; a diferencia de 31 (17,1%) de alelos de la variante G; en cuanto a los individuos que presentaron estadio IV de EP, se encontraron 2 (1,5%) alelos ancestrales A y 2 (1,1%) alelos de la variante G encontrados en este mismo grupo (*p=0,033)* (tabla 18).

En cuanto al análisis de la severidad de EP, se encontró en el grupo de individuos que presento EP severa donde se encontraron 7 (5,2%) alelos ancestrales A, a diferencia de 23 (12,7%) alelos de la variante G, lo que llevaría pensar que la presencia del alelo variante está asociado con la presencia y severidad de la EP; con un valor *p* significativo *(p=0,027)* (tabla 18).

Tabla 18. *Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896368 y diagnostico periodontal*

		DKK rs1896368				
		Ancestral		Variante		
		N	% de N	N	% de N	Valor *p*
Diagnostico periodontal	Ausencia	65	48,9%	69	38,1%	0,057
	Presencia	68	51,1%	112	61,9%	
P.gingivalis	Negativo	71	53,4%	99	54,7%	0,832
	Positivo	61	45,9%	81	44,8%	
Articulación dolorosa	Ausencia	102	76,7%	142	78,5%	0,711
	Presencia	31	23,3%	39	21,5%	
Articulación inflamada	Ausencia	123	92,5%	171	94,5%	0,475
	Presencia	10	7,5%	10	5,5%	
Anticuerpos IgG1.Pg	Ausencia	84	63,2%	108	59,7%	0,531
	Presencia	49	36,8%	73	40,3%	
Anticuerpos IgG2.Pg	Ausencia	88	66,2%	110	60,8%	0,328
	Presencia	45	33,8%	71	39,2%	
***P.gingivalis* Log10**	Ausencia	81	60,9%	113	62,4%	0,799
	Presencia	51	38,3%	67	37,0%	
Diagnostico periodontal nueva clasificación	Ausencia	65	48,9%	69	38,1%	
	Estadio I	14	10,5%	12	6,6%	
	Estadio II	43	32,3%	67	37,0%	
	Estadio III	9	6,8%	31	17,1%	0,033*
	Estadio IV	2	1,5%	2	1,1%	
Severidad de Enfermedad periodontal	Ausente	65	48,8%	69	38,1%	
	Leve	15	11,2%	13	7,1%	
	Moderada	46	34,6%	76	41,9%	0,027*
	Severa	7	5,2%	23	12,7%	

* *p <0,05*

9.2.16 Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1528873 y su asociación con el diagnóstico periodontal y parámetros clínicos articulares

Al analizar las frecuencias alélicas para el SNP DKK rs1528873 no se encontraron resultados significativos, en cuanto al análisis de diagnóstico periodontal y parámetros clínicos articulares (tabla 19).

Tabla 19. *Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1528873 y diagnostico periodontal*

		DKK rs1528873				
		Ancestral		Variante		
		N	% de N	N	% de N	Valor *p*
Diagnostico periodontal	Ausencia	98	41,9%	36	45,0%	0,626
	Presencia	136	58,1%	44	55,0%	
P.gingivalis	Negativo	128	54,7%	42	52,5%	0,785
	Positivo	105	44,9%	37	46,3%	
Articulación dolorosa	Ausencia	188	80,3%	56	70,0%	0,055
	Presencia	46	19,7%	24	30,0%	
Articulación inflamada	Ausencia	222	94,9%	72	90,0%	0,123
	Presencia	12	5,1%	8	10,0%	
Anticuerpos IgG1.Pg	Ausencia	139	59,4%	53	66,3%	0,278
	Presencia	95	40,6%	27	33,8%	
Anticuerpos IgG2.Pg	Ausencia	144	61,5%	54	67,5%	0,340
	Presencia	90	38,5%	26	32,5%	
***P.gingivalis* Log10**	Ausencia	145	62,0%	49	61,3%	0,974
	Presencia	88	37,6%	30	37,5%	
Diagnostico periodontal nueva clasificación	Ausencia	98	41,9%	36	45,0%	0,661
	Estadio I	18	7,7%	8	10,0%	
	Estadio II	85	36,3%	25	31,3%	
	Estadio III	31	13,2%	9	11,3%	
	Estadio IV	2	0,9%	2	2,5%	
Severidad de Enfermedad periodontal	Ausente	98	41,9%	36	45,0%	0,645
	Leve	19	8,1%	9	11,3%	
	Moderada	95	40,5%	27	33,8%	
	Severa	22	9,4%	8	10,0%	

** p <0,05*

9.2.17 Análisis de frecuencias alélicas del SNP KREMEN rs132274 y su asociación con el diagnostico periodontal y parámetros clínicos articulares

Al analizar las frecuencias alélicas del SNP KREMEN rs132274 con relación al diagnóstico periodontal, en los 314 alelos evaluados en nuestra población, se encontró que en el grupo de individuos con diagnóstico de EP se presentaron 81 (50%) alelos de la variante T; a diferencia de 99 (65,1%) alelos ancestrales C, con un valor *p* significativo (*p=0,007).* Igualmente, al analizar el diagnóstico de EP con la nueva clasificación, que los individuos con estadio I de EP se encontraron 14 (9,2%) alelos ancestrales C; a diferencia de 12 (7,4%) alelos de la variante T. En los individuos que presentaron estadio II de EP, se encontró 65 (42,8%) alelos ancestrales C y 45 (27,8%) alelos de la variante T. En cuanto a los individuos con estadio III de EP, se encontraron 17 (11,2%) alelos ancestrales C; a diferencia de 23 (14,2%) alelos de la variante T, que presentaron este mismo estadio. En los individuos que presentaron estadio IV de EP, se encontraron 3 (2%) alelos ancestrales C; a diferencia de 1(0,6%) de los alelos de la variante T, con un valor *p* significativo *(p=0,024)* (tabla 19). No se encontraron diferencias entre los otros parámetros evaluados para los alelos analizados. La presencia de alelo variante T para KREMEN rs132274 se asocia con la ausencia de EP *(p=0,007).*

En cuanto al análisis de la severidad de EP, se encontró una tendencia en el grupo de individuos que presento EP moderada donde se encontraron 72 (47,4%) alelos ancestrales C, a diferencia de 50 (39,9%) alelos de la variante T, lo que llevaría a pensar que tener el alelo ancestral está relacionado la presencia de EP moderada; con un valor *p* significativo *(p=0,007)* (tabla 20).

Tabla 20. *Análisis de frecuencias alélicas del SNP KREMEN rs132274 y diagnostico periodontal*

		KREMEN rs132274				
		Ancestral		**Variante**		
		N	**% de N**	**N**	**% de N**	**Valor *p***
Diagnostico periodontal	Ausencia	53	34,9%	81	50,0%	0,007*
	Presencia	99	65,1%	81	50,0%	
P.gingivalis	Negativo	89	58,6%	81	50,0%	0,126
	Positivo	62	40,8%	80	49,4%	
Articulación dolorosa	Ausencia	113	74,3%	131	80,9%	0,165
	Presencia	39	25,7%	31	19,1%	

Articulación inflamada	Ausencia	140	92,1%	154	95,1%	0,284
	Presencia	12	7,9%	8	4,9%	
Anticuerpos IgG1.Pg	Ausencia	91	59,9%	101	62,3%	0,653
	Presencia	61	40,1%	61	37,7%	
Anticuerpos IgG2.Pg	Ausencia	93	61,2%	105	64,8%	0,505
	Presencia	59	38,8%	57	35,2%	
***P.gingivalis* Log10**	Ausencia	102	67,1%	92	56,8%	0,058
	Presencia	49	32,2%	69	42,6%	
Diagnostico periodontal nueva clasificación	Ausencia	53	34,9%	81	50,0%	0,024*
	Estadio I	14	9,2%	12	7,4%	
	Estadio II	65	42,8%	45	27,8%	
	Estadio III	17	11,2%	23	14,2%	
	Estadio IV	3	2,0%	1	0,6%	
Severidad de Enfermedad periodontal	Ausente	53	34,9%	81	50%	0,007*
	Leve	16	10,5%	12	7,4%	
	Moderada	72	47,4%	50	30,9%	
	Severa	11	7,2%	19	11,7%	

** p <0,05*

9.2.18. Análisis de frecuencias alélicas del SNP SOST rs6503475 y su asociación con el diagnostico periodontal y parámetros clínicos articulares

Al analizar las frecuencias alélicas del SNP SOST rs6503475 con relación al diagnóstico de EP, en cuanto a presencia o ausencia de EP y su diagnóstico con la nueva clasificación; no se encontraron diferencias significativas. Igualmente para los parámetros clínicos articulares, no se mostraron diferencias en cuanto a los alelos evaluados. En cuanto a la presencia de *P. gingivalis* se encontró que el 58,8% de los alelos ancestrales A que corresponden a 104 alelos, se relacionaban con la ausencia de *P. gingivalis* a diferencia de un 48,2% de los alelos de la variante G; que corresponden a 66 alelos, con un valor *p* significativo *(p=0,048)* (tabla 21).

Tabla 21. *Análisis de frecuencias alélicas del SNP SOST rs6503475 y diagnostico periodontal*

		SOST rs6503475				
		Ancestral		Variante		
		N	% de N	N	% de N	Valor *p*
Diagnostico periodontal	Ausencia	70	39,5%	64	46,7%	0,203
	Presencia	107	60,5%	73	53,3%	
P.gingivalis	Negativo	104	58,8%	66	48,2%	0,048*
	Positivo	71	40,1%	71	51,8%	
Articulación dolorosa	Ausencia	143	80,8%	101	73,7%	0,136
	Presencia	34	19,2%	36	26,3%	
Articulación inflamada	Ausencia	169	95,5%	125	91,2%	0,127
	Presencia	8	4,5%	12	8,8%	
Anticuerpos IgG1.Pg	Ausencia	107	60,5%	85	62,0%	0,774
	Presencia	70	39,5%	52	38,0%	
Anticuerpos IgG2.Pg	Ausencia	110	62,1%	88	64,2%	0,704
	Presencia	67	37,9%	49	35,8%	
***P.gingivalis* Log10**	Ausencia	119	67,2%	75	54,7%	0,017*
	Presencia	56	31,6%	62	45,3%	
Diagnostico periodontal nueva clasificación	Ausencia	70	39,5%	64	46,7%	0,291
	Estadio I	17	9,6%	9	6,6%	
	Estadio II	68	38,4%	42	30,7%	
	Estadio III	21	11,9%	19	13,9%	
	Estadio IV	1	0,6%	3	2,2%	
Severidad de Enfermedad periodontal	Ausente	70	39,5%	64	46,7%	0,069
	Leve	18	10,1%	10	7,2%	
	Moderada	77	43,6%	45	32,8%	
	Severa	12	6,7%	18	13,1%	

** p <0,05*

9.2.19 Análisis de frecuencias alélicas del SNP LRP5 rs3736228 y su asociación con el diagnostico periodontal y parámetros clínicos articulares

Al analizar las frecuencias alélicas para el SNP LRPS rs3736228 no se encontraron resultados significativos, en cuanto al análisis de diagnóstico periodontal y parámetros clínicos articulares (tabla 22).

Tabla 22. *Análisis de frecuencias alélicas del SNP LRP rs3736228 y diagnostico periodontal*

		LRPS rs3736228				
		Ancestral		**Variante**		
		N	**% de N**	**N**	**% de N**	**Valor *p***
Diagnostico periodontal	Ausencia	114	41,8%	20	48,8%	0,397
	Presencia	159	58,2%	21	51,2%	
P.gingivalis	Negativo	150	54,9%	20	48,8%	0,431
	Positivo	121	44,3%	21	51,2%	
Articulación dolorosa	Ausencia	210	76,9%	34	82,9%	0,389
	Presencia	63	23,1%	7	17,1%	
Articulación inflamada	Ausencia	254	93,0%	40	97,6%	0,269
	Presencia	19	7,0%	1	2,4%	
Anticuerpos IgG1.Pg	Ausencia	169	61,9%	23	56,1%	0,477
	Presencia	104	38,1%	18	43,9%	
Anticuerpos IgG2.Pg	Ausencia	175	64,1%	23	56,1%	0,322
	Presencia	98	35,9%	18	43,9%	
***P.gingivalis* Log10**	Ausencia	167	61,2%	27	65,9%	0,603
	Presencia	104	38,1%	14	34,1%	
Diagnostico periodontal nueva clasificación	Ausencia	114	41,8%	20	48,8%	0,702
	Estadio I	23	8,4%	3	7,3%	
	Estadio II	95	34,8%	15	36,6%	
	Estadio III	37	13,6%	3	7,3%	
	Estadio IV	4	1,5%	0	0,0%	
Severidad de Enfermedad periodontal	Ausente	114	41,8%	20	48,8%	0,720
	Leve	25	9,2%	3	7,3%	
	Moderada	106	38,8%	16	39,0%	
	Severa	28	10,3%	2	4,9%	

** p <0,05*

9.2.20 Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896367 y su asociación con parámetros de diagnóstico periodontal

Al analizar las frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896367, en relación con los parámetros periodontales se encontró una mediana de 16,07 (3,57- 32,62) de sitios con pérdida de nivel de inserción (CAL) mayor o igual a 3 mm en individuos que presentaban el alelos ancestral G, a diferencia de una mediana de 8,89 (0,60-26,85) de sitios con una CAL mayor o igual a 3 mm en individuos que presentaban el alelo variante A, con un valor *p* significativo *(p=0,036)* (figura 13). Para los otros parámetros como numero de dientes, índice de placa, índice gingival, sangrado al sondaje, porcentaje de sitios con bolsa periodontal, porcentaje de sitios con CAL mayor o igual a 2mm, mayor o igual a 4 mm y mayor o igual a 6 mm, no se encontraron diferencias significativas en los alelos de la población analizada (tabla 23).

Tabla 23. *Análisis de frecuencias alélicas de SNP DKK rs1896367 y parámetros periodontales*

	DKK rs1896367						
	Ancestral			**Variante**			
	Mediana	**Percentil 25**	**Percentil 75**	**Mediana**	**Percentil 25**	**Percentil 75**	**valor *p***
Numero de dientes	26,00	22,00	28,00	27,00	21,00	28,00	0,425
Índice de placa	44,00	26,00	67,00	53,00	30,00	75,00	0,292
Índice gingival	24,00	11,00	46,00	27,00	14,00	54,00	0,172
Sangrado al sondaje	33,00	18,00	51,00	39,00	23,00	58,00	0,096
% bolsas de 4 a 5	1,33	0,00	3,57	1,33	0,00	3,57	0,837
% bolsas de >5	0,00	0,00	1,23	0,00	0,00	1,15	0,877
% CAL ≥ 2mm	33,33	10,12	56,94	24,69	8,93	50,60	0,091
% CAL ≥ 3mm	16,07	3,57	32,62	8,89	0,60	26,85	0,036*
% CAL ≥ 4mm	3,85	0,00	13,48	1,52	0,00	7,05	0,016
% CAL ≥ 6mm	0,00	0,00	1,39	0,00	0,00	0,00	0,107
% CAL TOTAL	41,67	15,18	70,00	39,52	10,71	68,52	0,451

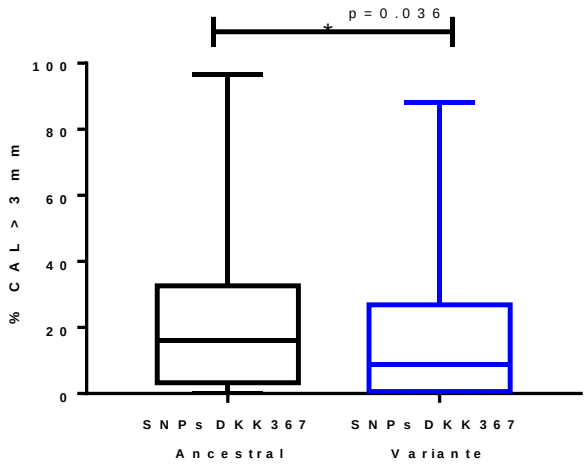


Figura 13. Análisis de frecuencias alélicas de SNP DKK rs1896367 y parámetros periodontales

9.2.21 Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896368 y su asociación con parámetros de diagnóstico periodontal

Al analizar las frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896368, en relación con los parámetros periodontales se encontró una mediana de 10,75 (0,60-26,85) de sitios con CAL mayor o igual a 3 mm en individuos que presentaban el alelo ancestral A, a diferencia de una mediana de 16,67 (4,94-33,33) de sitios con una CAL mayor o igual a 3 mm en individuos que presentaban el alelo variante G, con un valor *p* significativo *(p=0,009)*. Igualmente, se encontró una mediana de 1,79 (0,00-10,0) de sitios con CAL mayor o igual a 4 mm en los individuos que presentaban el alelo ancestral A; a diferencia de una mediana de 4,17 (0,57-15,22) de sitios con un CAL mayor o igual a 4mm que presentaban el alelo variante G, siendo este mayor en este grupo, con un valor *p* significativo (figura 14) *(p=0,004)*. Para los otros parámetros como numero de dientes, índice de placa, índice gingival, sangrado al sondaje, porcentaje de sitios con bolsa periodontal, porcentaje de sitios con CAL mayor o igual a 2mm y mayor o igual a 6 mm, no se encontraron diferencias significativas en los alelos de la población analizada (tabla 24).

Tabla 24. *Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1896368 y parámetros periodontales*

	DKK rs1896368						
	Ancestral			Variante			
	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	valor *p*
Numero de dientes	27,00	21,00	28,00	26,00	22,00	28,00	0,720
Índice de placa	52,00	28,00	75,00	44,00	27,00	67,00	0,447
Índice gingival	24,00	14,00	54,00	24,00	11,00	48,00	0,594
Sangrado al sondaje	36,00	22,00	54,00	34,00	18,00	54,00	0,657
% bolsas de 4 a 5	1,59	0,00	3,57	1,19	0,00	3,57	0,517
% bolsas de >5	0,00	0,00	1,19	0,00	0,00	1,23	0,898
% CAL ≥ 2mm	25,49	8,02	54,63	33,33	12,50	56,94	0,092
% CAL ≥ 3mm	10,75	0,60	26,85	16,67	4,94	33,33	0,009*
% CAL ≥ 4mm	1,79	0,00	10,00	4,17	0,57	15,22	0,004*
% CAL ≥ 6mm	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,45	0,105
% CAL TOTAL	37,50	9,82	68,52	41,67	16,67	72,00	0,237

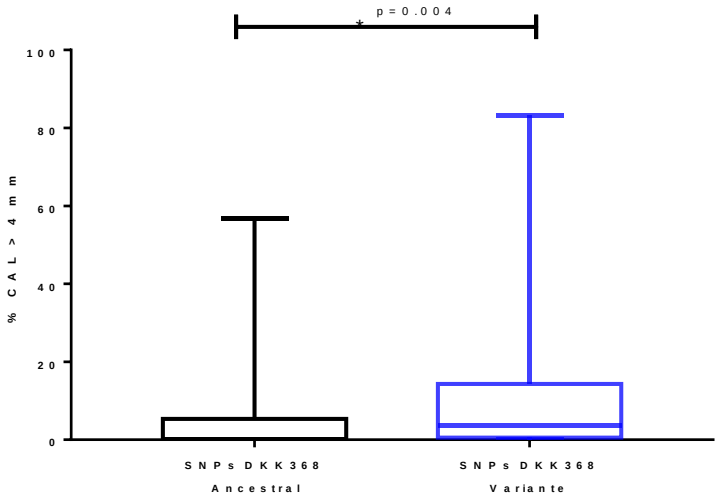


Figura 14. Análisis de frecuencias alélicas de SNP DKK rs1896368 y parámetros periodontales

9.2.22 Análisis de frecuencias alélicas del SNP DKK rs1528873 y su asociación con parámetros periodontales.

Al analizar las frecuencias alélicas para el SNP DKK rs1528873 no se encontraron resultados significativos, en cuanto a las variables periodontales.

9.2.23 Análisis de frecuencias alélicas del SNP KREMEN rs132274 y su asociación con parámetros de diagnóstico periodontal

Al analizar las frecuencias alélicas del SNP KREMEN rs132274, en relación con los parámetros periodontales evaluados, se encontró que para los individuos que presentaban el alelo ancestral C se obtuvo una mediana de 25 (20-28) dientes presentes en boca de cada individuo; a diferencia de una mediana de 27 (24-28) dientes presentes para los individuos que presentaban el alelo variante T, con un valor *p* significativo *(p=0,005).* Igualmente, se encontró una mediana de 35,77 (19,91-58,9) de sitios con CAL mayor o igual a 2 mm en los individuos que presentaban el alelo ancestral C; a diferencia de una mediana de 25,49 (8,02-52,08) de sitios con un CAL mayor o igual a 2mm que presentaban el alelo variante T, siendo este mayor en este grupo, con un valor *p* significativo *(p=0,029)* (tabla 25).

Se encontró una mediana de 4,94 (0,00-14,42) de sitios con CAL mayor o igual a 4 mm en los individuos que presentaban el alelo ancestral C; a diferencia de una mediana de 2,8 (0,00-11,11) de sitios con un CAL mayor o igual a 4mm que presentaban el alelo variante T, siendo este mayor en este grupo, con un valor *p* significativo *(p=0,054).* La mediana de sitios con CAL total fue mayor en los individuos que presentaban el alelo ancestral C, que la variante T, siendo esta de 50,57(18,19- 78,49), con un valor *p* significativo *(p=0,002)* (tabla 25).

Tabla 25. *Análisis de frecuencias alélicas del SNP KREMEN rs132274 y parámetros periodontales*

	KREMEN rs132274						
	Ancestral			**Variante**			
	Mediana	**Percentil 25**	**Percentil 75**	**Mediana**	**Percentil 25**	**Percentil 75**	**valor *p***
Numero de dientes	25,00	20,00	28,00	27,00	24,00	28,00	0,005*
Índice de placa	48,00	23,00	67,00	44,50	29,00	75,00	0,578
Índice gingival	23,00	7,00	46,00	27,00	14,00	52,00	0,107
Sangrado al sondaje	33,00	21,50	52,00	36,50	18,00	54,00	0,823
% bolsas de 4 a 5	1,08	0,00	3,57	1,57	0,00	3,57	0,156

% bolsas de >5	0,00	0,00	0,88	0,00	0,00	1,33	0,604
% CAL ≥ 2mm	35,77	10,91	58,09	25,49	8,02	52,08	0,029*
% CAL ≥ 3mm	16,04	3,94	30,71	10,93	0,98	29,49	0,076
% CAL ≥ 4mm	4,94	0,00	14,42	2,18	0,00	11,11	0,054*
% CAL ≥ 6mm	0,00	0,00	0,82	0,00	0,00	1,15	0,384
% CAL TOTAL	50,57	18,19	78,49	36,24	9,38	60,29	0,002*

9.2.24 Análisis de frecuencias alélicas del SNP SOST rs6503475 y su asociación con parámetros de diagnóstico periodontal

Al analizar las frecuencias alélicas para el SNP SOST rs6503475 no se encontraron resultados significativos, en cuanto a las variables periodontales.

9.2.25 Análisis de frecuencias alélicas del SNP LRP rs3736228 y su asociación con parámetros de diagnóstico periodontal

Al analizar las frecuencias alélicas para el SNP LRP rs3736228 no se encontraron resultados significativos, en cuanto a las variables periodontales.

10. DISCUSIÓN

De las características principales de la EP, es la pérdida ósea, la cual está condicionada por un fenómeno inflamatorio crónico, el cual puede desencadenar una desregulación en el eje de modulación ósea osteoblástico / osteoclástico, y está perdida del equilibrio va a producir el fenómeno de la reabsorción ósea como tal (*APP, 2015; Liu et al.; 2010; Bartold et al.; 2010*). De las diferentes vías encargadas de la modulación de la masa ósea a nivel sistémico se ha descrito la vía del eje RANK/RANKL/OPG en relación con un modelo que explica cómo está afecta el tejido óseo alveolar (*Bartold et al.; 2010; Crotti et al.; 2003; Glass et al.; 2005*). Sin embargo, no es la única vía relacionada con la modulación ósea fisiológica, existe otra vía como la Wnt; la cual es importante para la diferenciación osteoblástica y regulación de la actividad osteoclástica (*Logan & Nusse, 2004; Krishnan et al.; 2006*).

La presencia de SNPs; en las moléculas que interactúan en la vía Wnt, como sus inhibidores SOST, DKK y KREMEN, o sus receptores como LRP5/6, puede ocasionar cambios en la dimensión de la masa ósea y han sido descritas en relación con pérdida de la masa ósea en enfermedades inflamatorias como la AR y la osteoporosis (*Westendorf et al.; 2004*); pero su papel en la EP no ha sido definido, así como la escaces de estudios de esta vía en la población sistémicamente sana (*Wang et al.; 2011*).

Las proteínas KREMEN y DKK, son reguladores de la activación y ensamblaje de la vía intracelular; al unirse conjuntamente e interactuar con los receptores LRP5 y LRP6 van a provocar una internalización de este complejo para ser degradado de manera intracelular impidiendo la activación de la vía intracelular, estas proteínas actúan fisiológicamente juntas (*Xiao et al.; 2011*).

DKK es considerada una molécula inhibidora y su interacción del complejo DKK / LRP con KREMEN, es lo que permite la internalización del complejo conformado por las tres moléculas para su degradación, disminuyendo así el número de los co- receptores Wnt disponibles para señalización (*Krishnan et al.; 2006*); la falta de su regulación, o el aumento o disminución de la afinidad a los receptores LRP afectan los procesos de la regulación de la osteoblastogénesis, al aumentar sus niveles no permite que las moléculas activadoras Wnts puedan unirse a sus receptores manteniendo así un perfil osteoclástico sin posibilidad de formación ósea posterior (*Krishnan et al.; 2006*).

Aunque nosotros no realizamos la cuantificación de proteína en suero y debido a la falta de información en el área, vale la pena referirse al estudio realizado en pacientes sistémicamente sanos dividido en grupos según el diagnóstico periodontal el cual mostró que los niveles de proteínas DKK-1 y SOST fueron más altos en tejido gingival y suero de pacientes con periodontitis crónica (*Napimoga et al.; 2014*). Además, los niveles de expresión de DKK-1 eran mayores en el tejido gingival de pacientes con periodontitis crónica, lo que podría llevar a considerar que DKK-1 es el principal miembro de la familia dickkoff para inhibir la vía de Wnt en periodontitis (*Napimoga et al.; 2014*).

Heredia et al.; [2016], evaluando igualmente la asociación entre niveles en fluido crevicular de DKK y la pérdida ósea asociada a la presencia de EP en 24 pacientes con AR y controles, encontró que los niveles tanto séricos como de fluido crevicular se asociaban con el diagnóstico periodontal y su severidad *(Heredia et al.; 2016*).

Miceli et al.; [2015], en una cohorte de 646 pacientes; reportó portadores del alelo de riesgo rs1896368 también tenían niveles séricos significativamente más altos de DKK-1, en un estudio realizado en pacientes con AR (*Miceli et al.; 2015*). Este estudio también reporto un riesgo de 1.5 veces para los portadores del SNPs DKK rs1896368, asociado a la severidad de la pérdida ósea articular (*Miceli et al.; 2015*), sin embargo, se aclara que hay poca disponibilidad de estudios que respalden la hipótesis de que el SNPs sea la causa principal de que aumenten los niveles séricos de la proteína DKK (*Miceli et al.; 2015*). Igualmente, en un estudio realizado en pacientes con diagnóstico de AR, se reportó que los pacientes que tienen los alelos de riesgo de varias variantes genéticas en Dkk-1 tienen un nivel en suero más alto de Dkk-1 y presentan mayor progresión en el tiempo (*Rooy et al.; 2012*).

Se ha definido los genotipos nativos para el DKK rs1896367, donde sus dos alelos ancestrales se ha definido como GG, la variante o la presencia de SNP corresponde a GA, el cual se describiría como SNP heterocigoto o AA que se describiría como el SNP homocigoto (*Cardona et al.; 2018*). En nuestro estudio se encontró una frecuencia genotípica en la población sistémicamente sana, de SNP de DKK rs1896367 de 55,41%. Un estudio previo de la línea de investigación realizado en población colombiana de 63 paciente; donde se evaluaron pacientes con AR y controles reportó una frecuencia del SNP DKK rs1896367 de 43,4% en la población estudiada (*Godoy et al.; 2018*).

De los individuos incluidos en nuestro estudio el 46.5% presentaron genotipo heterocigoto, el 8,92% presentaron genotipo homocigótico y el 44,59% presentaron genotipo ancestral. En contraste con estos resultados, un estudio realizado en población colombiana de 63 pacientes con diagnóstico de AR; reportó que el 53.7% de los controles sanos presento genotipo nativo para DKK rs1896367, el 38.8% SNP heterocigoto y el 7,4% SNP homocigoto (*Godoy et al.; 2018*).

En un estudio realizado en 94 individuos sanos de la población de Antioquia, donde se presentaban 188 alelos estudiados, se reportó frecuencias alélicas de los nucleótidos complementarios, se identificaron frecuencias alélicas para el SNP DKK rs1896367, donde se reportó que 78 individuos de 94 presentaron el alelo ancestral, que corresponde a 115 alelos ancestrales C de 188 alelos totales, y 57 individuos de 94, donde 73 alelos corresponden a la variante T de 188 alelos estudiados (*Mil genomas.; ncbi*).

La interpretación de los datos de la población antioqueña nos permite inferir de una manera aproximada que el 61,17% que corresponde a 0,61 que representa el alelo ancestral C y en nuestro grupo de estudio proveniente de población de diferentes regiones de Colombia 67.8%; que corresponde a 0,67 que representa el alelo ancestral; las cuales se consideran frecuencias similares (*Mil genomas.; ncbi*). De la misma manera al analizar los datos de la variante alélica T en dicha población fue de 38,82%; que corresponde a 0,38; (*Mil genomas.; ncbi*); frente a lo encontrado por nosotros de un 32,16%; que corresponde a 0,32. Esto nos hace suponer que el mestizaje por regiones a nivel nacional no influye en la presentación de este SNP.

Los principales hallazgos en nuestro estudio en población sana, clasificada según su diagnóstico periodontal, mostro que para el SNP de DKK rs1896367 (incluyendo tanto heterocigotos como homocigotos) mostro una frecuencia mayor (67,2%) en individuos sanos con ausencia de EP, lo que fue estadísticamente significativo al compararlo con la población que presenta EP. Igualmente, el porcentaje más alto en esta población fue para el genotipo heterocigoto (58,2%). En contraste, con estos hallazgos, un estudio realizado en población colombiana de 63 pacientes con AR y controles sanos, reporto que el SNP DKK rs1896367 homocigótico se asoció en mayor frecuencia con erosiones en los pacientes con AR (*Godoy et al.; 2018*). Vale la pena recordar que este es un grupo de pacientes sistémicamente comprometidos con una entidad de base que se asocia a pérdida ósea, lo cual puede enmascarar los resultados de la asociación periodontal; lo cual podría explicar porque en nuestro estudio se encontró el genotipo homocigoto solamente en un 8,9% de los

pacientes con presencia de EP sanos sistémicamente; también, se encontró que ninguno de los individuos que presento este SNP homocigótico presento EP severa; sino que el 9,8% presento forma moderada y el 14,3% forma leve de la EP. Colocando a este polimorfismo en un papel posible mente protector para el desarrollo de EP y severidad dado que aún en estado no homocigoto no se encontró asociación.

De otra manera, Cardona et al.; [2018], en un estudio que evaluó en población colombiana, en 63 pacientes con AR, la expresión homocigota de DKK rs1896367 fue más frecuente en el grupo que presentaba EP, pero no severa (*Cardona et al.; 2018*).

Contrastando estos resultados; un estudio realizado por, Rooy et al.; [2012], con una cohorte de 1418 pacientes con AR, reportó una relación significativa entre la presencia de 6 SNPs de DKK, entre los cuales se describían DKK rs1896368, rs10762715, rs1528873, rs1441124, rs1194750 y rs1896367; siendo el SNP de DKK rs1896367 uno de los que más estaban asociados con el daño articular en pacientes con AR (*Rooy et al.; 2012*). Sin embargo, en nuestro estudio solo un 8,9% de los pacientes con diagnóstico de EP, presentaron el SNP sin asociaciones estadísticas.

En nuestro estudio al analizar las frecuencias genotípicas con parámetros clínicos de diagnóstico periodontal se encontró que los individuos que presentaban SNP DKK rs1896367 no presentaron mayor porcentaje sitios con CAL mayor o igual a 4 y 5 mm. Igualmente al analizar la severidad de EP, se encontró una tendencia en el grupo de individuos que presento EP severa donde se encontraron 23 (10,8%) alelos ancestrales G, a diferencia de 7 (7%) alelos de la variante A, lo que llevaría a pensar que tener el alelo ancestral está relacionado con la presencia y severidad de la EP. Estos hallazgos se considerarían importantes teniendo en cuenta que este es el primer estudio en evaluar la frecuencia de este SNP en pacientes sistémicamente sanos con diagnóstico de EP. En nuestro estudio, se encontró al analizar las frecuencias alélicas para el SNP DKK rs1896367, donde en los individuos que presentaban el alelo ancestral G presentaron una mediana 16,07(3,57-32,62) de sitios con CAL mayor o igual a 3 mm; la cual fue mayor a la encontrada en los individuos con el alelo variante A. En cuanto al análisis de la severidad de EP, se encontró una tendencia en el grupo de individuos que presento EP severa donde se encontraron 23 (10,8%) alelos ancestrales G, a diferencia de 7 (7%) alelos de la variante A, lo que llevaría a pensar que tener el alelo ancestral está relacionado con la presencia y severidad de la EP.

Por otra parte, El 80,25% de los individuos estudiados presentaron el SNP DKK rs1896368; lo que se asemeja a lo reportado en un estudio realizado en población colombiana, en 63 pacientes con AR temprana y controles sanos, donde se reportó que el 87,5% de los sujetos incluidos presento el SNP DKK rs1896368 *(Godoy et al.; 2018)*.

Se ha definido los genotipos nativos para el DKK rs1896368, donde el alelo ancestral se ha definido como AA, la variante o la presencia de SNP corresponde a AG, el cual se describiría como SNP heterocigoto o GG que se describiría como el SNP homocigoto (*Cardona et al.; 2018*).
En el estudio en población antioqueña, en individuos sanos donde se estudiaron 94 individuos con 188 alelos presentes, se reportaron frecuencias alélicas complementarias para SNP DKK rs1896368, en donde se encontró que 96 alelos correspondían a la variante C representados en una frecuencia alélica que corresponde a 0,51, que representa el 51,06%; (*Mil genomas.; ncbi*). En nuestro estudios encontramos que 181 alelos, que representan el 0,5764 que representa el 57,64% para la variante C. Resultados que resultan ser relativamente parecidos a diferencia del SNP anterior.

En poblaciones como México, en un estudio realizado en 64 individuos sanos, donde se estudiaron los 128 alelos presentes, pueden encontrarse frecuencias alélicas para DKK rs1896368 reportadas, donde al comparar con la población antioqueña se puede encontrar que el 71,09%, el cual se representa en 0,7109, en la población mexicana presento el alelo variante, en contraste con un 51,06% de la población antioqueña y 57.04% en este estudio actualmente presentado. Igualmente, el 28,91%, el cual representa 0,2891, de la población mexicana presento el alelo nativo, a diferencia del 48,94% en la población antioqueña. Lo que nos pone a pensar en la influencia de la diversidad étnica para la presentación de estas variantes y su posible papel en el desarrollo de patologías (*Mil genomas.; ncbi*).

Otro de los principales hallazgos en nuestro estudio, realizado como se mencionó anteriormente, encontramos que el SNP DKK rs1896368 tenía una frecuencia más alta en los individuos con EP (85,6%) con una significancia estadística. De manera interesante encontramos que el 100% de los individuos con diagnóstico de EP severa presentó este SNP, el 85,2% con diagnóstico de EP moderada; y aunque no se encontraron diferencias significativas posiblemente por tamaño de muestra, la forma predominante fue el genotipo heterocigoto.

Ahora bien, al analizar el diagnóstico de EP por estadios, se encontró que el DKK rs1896368, se encontró en el 100 % de los pacientes con EP estadio III y IV, este es de acuerdo a la nueva clasificación que instauro en 2018, por lo cual es el primer estudio que analiza la severidad de la EP con la nueva clasificación.

En semejanza con estos hallazgos, el estudio realizado en población colombiana que incluyo pacientes con AR, reportó que el SNP DKK rs1896368 se asoció con actividad reumática, y fue el SNP DKK rs1896368 heterocigoto asociado con mayor frecuencia a presentar EP, en pacientes con AR (48); lo cual concuerda con lo encontrado en nuestra población estudiada.

De la misma forma, Cardona Rincón et al, en su estudio en pacientes con AR, al evaluar la EP y algunas variables periodontales, encontraron que los individuos con una expresión heterocigótica de polimorfismo DKK rs1896368 tuvieron una frecuencia de EP más alta (*Cardona et al.; 2018*). Realmente es escasa la literatura que nos permite contrastar nuestros resultados dado que este estudio es el primero realizado que compara la presencia de SNPs de Wnt en población sistémicamente sana con y sin EP, teniendo en cuenta las otras variables periodontales.

Sin embargo, este SNP está asociado con actividad reumática y erosiones activas (*Cardona et al.; 2018; Godoy et al.; 2018*); Rooy et al.; [2012]; en una cohorte de 1418 pacientes con diagnóstico de AR; donde se reporta la presencia de 6 SNPs de DKK, entre los cuales se describían DKK rs1896368, rs10762715, rs1528873, rs1441124, rs1194750 y rs1896367, siendo DKK rs1896368 el más frecuente en la población incluida, así como el más asociado a erosiones y una mayor severidad del daño articular (*Rooy et al.; 2012*).

Otro estudio realizado por Steenbergen et al.; [2015] en 645 pacientes con diagnóstico de AR divididos en 2 grupos según la actividad de la enfermedad, se reportó la presencia de SNP DKK rs1896368, en el 90% de los pacientes diagnosticados con la AR clínicamente activa, asociándose además con la severidad de la destrucción articular (*Steenbergen et al.; 2015*).

En nuestro estudio al analizar las frecuencias genotípicas con parámetros clínicos de diagnóstico periodontal se encontró que los individuos que presentaban SNP DKK rs1896368 presentaron mayor porcentaje de sitios con CAL mayor o igual a 4 mm, 3 mm, 2 mm y 5 mm; a diferencia de los individuos que no presentaron este SNP. Estos hallazgos nos llevan a pensar en la hipótesis de que la presencia de este SNP podría estar relacionada con mayor pérdida ósea. Dato muy

interesante en nuestra población teniendo en cuenta que este no encontramos estudios previos en donde evalúen la frecuencia de este SNP en pacientes sistémicamente sanos con diagnóstico de EP. Igualmente, al realizar el análisis la severidad de EP, se encontró que en el grupo de individuos que presento EP severa donde se encontraron 7 (5,2%) alelos ancestrales A, a diferencia de 23 (12,7%) alelos de la variante G, lo que llevaría pensar que la presencia del alelo variante está asociado con la presencia y severidad de la EP; datos importantes que deben ser corroborados en estudios longitudinales. Otro hallazgo importante que se obtuvo al analizar la frecuencias alélicas en nuestro estudio fue para el SNP DKK rs1896368, donde se encontró que de los 314 alelos analizados de nuestra población, se encontró una mediana de 16,67 (4,94-33,33) de sitios con una CAL mayor o igual a 3 mm en individuos que presentaban el alelo variante G; la cual fue mayor que la encontrada para los individuos que presentaban el alelo ancestral A, donde se obtuvo una mediana de 10,75 (0,60-26,85) de sitios con CAL mayor o igual a 3.

Otro hallazgo en nuestro estudio, se refiere al SNP DKK rs1528873, para el cual en nuestra población estudiada se encontró una frecuencia de 48,41%, siendo el 45,86% del total de la población SNP heterocigoto, el 2,55% homocigoto y el 59,51% genotipo ancestral. Sin embargo, este SNP no mostro diferencias significativas entre los grupos según el diagnóstico periodontal. En el estudio realizado en población colombiana, en pacientes con AR y controles, se reportó una frecuencia de este SNP de 45,6% en la población estudiada, siendo el 48,3% heterocigoto y el 44,1% homocigoto, considerando que la frecuencia más alta del SNP heterocigoto se encontró en controles, y la frecuencia más alta del SNP homocigoto en pacientes con AR, contrastando con nuestros resultados donde encontramos la frecuencia más alta para el SNP heterocigoto y un frecuencia mínima para el SNP homocigoto, en comparación con lo encontrado en el estudio mencionado (*Godoy et al.; 2018*).

Se ha definido los genotipos nativos para el DKK rs1528873, donde el alelo ancestral se ha definido como TT, la variante o la presencia de SNP corresponde a TG, el cual se describiría como SNP heterocigoto o GG que se describiría como el SNP homocigoto (*Cardona et al.; 2018*).

En el estudio realizado en población de Antioquia, de 188 alelos reportados, las frecuencias alélicas complementarias reportadas para este SNP DKK rs1528873 encontradas en población sana a un

50,53%, porcentaje que representa el 0,5053, para el alelo ancestral A, al comparar con nuestra población se encontró una frecuencia alélica más alta, donde 234 alelos ancestrales A que corresponden del 74,52%; lo que representa el 0,74; datos que presentan diferencias con las frecuencias encontradas anteriormente. Igualmente en la población antioqueña se encontró en un 49,47%, que representa el 0,4947; para la variante C, frente a un 25,47%; que representa 0,25; encontrado en nuestro estudio (*Mil genomas.; ncbi*).

Rooy et a.;l [2012], en una cohorte de 1418 pacientes con diagnóstico de AR, mostro que el SNP DKK rs1528873 se asoció con frecuencia de actividad articular, erosiones y destrucción articular, con una significancia estadística (*Rooy et al.; 2012*). Sin embargo, en nuestro estudio no encontramos ningún valor significativo frente a las variables periodontales en la población incluida.

En cuanto a KREMEN, molécula cuya función como se había mencionado anteriormente, es formar un complejo junto a DKK y LRP, para permitir un posterior degradación proteosómica (*Xiao et al.; 2011*); en nuestro estudio se encontraron frecuencias genotípicas SNP KREMEN rs132274 en población sana del 72,61%. El 27,39% de los individuos presento el genotipo nativo para KREMEN rs132274, el 30,57% presento SNP homocigoto y el 42,04% SNP heterocigoto.

Se han definido los genotipos nativos para el KREMEN rs132274, donde el alelo ancestral corresponde a CC, la variante corresponde a CT que sería el SNP heterocigoto y TT que sería el SNP homocigoto (*Mil genomas.; ncbi*).

En el estudio realizado en población de Antioquia, donde se incluyeron 94 individuos, para reportar 188 alelos, se reportaron frecuencias alélicas complementarias para KREMEN rs132274, donde se encontró una frecuencia de 36,17%; lo cual representa el 0,3617; para el alelo ancestral C, el cual se compara con nuestros resultados donde obtuvimos una frecuencia alélica del 48,40%; el cual representa el 0,48; para el alelo ancestral. De manera diferente obtuvimos una frecuencia alélica de 55,09%; que representa el 0,55; para la variante T, frente a un 63,83%; que representa el 0,6383; en la población antioqueña *(Mil genomas.; ncbi).*

En nuestro estudio se encontraron diferencias significativas en cuanto a la presencia del genotipo con SNP de KREMEN rs132274, las cuales mostraron una frecuencia mayor en el grupo sin EP (82,1%) al compararlo con el grupo con EP con solo el 24.4 %, siendo en su mayoría heterocigoto

(43,3%). Además, en los individuos que presentan EP el 34.4% presentan el genotipo ancestral frente al 17.9 %, lo cual hace pensar que la presencia de este polimorfismo puede generar alguna protección para el desarrollo de EP.

En el estudio realizado por Rooy et al [2012], reportó que el SNP para KREMEN rs132274, en su mayoría heterocigoto, tuvo asociación significativa con destrucción articular severa, sin embargo se aclara que después de realizar la corrección de las pruebas múltiples y el valor p ajustado no hubo diferencias significativas (*Rooy et al.; 2012*).

En nuestro estudio al analizar las frecuencias genotípicas con parámetros clínicos de diagnóstico periodontal se encontró que los individuos que no presentaban SNP KREMEN rs132274 presentaron mayor porcentaje de sitios con CAL mayor o igual a 2 mm, a diferencia de los individuos que presentaron el SNP. Lo que llevaría a pensar en la hipótesis de que la presencia de este SNP tendría un efecto protector.

En cuanto a SOST, esclerostina, molécula considerada antagonista o inhibitoria de la diferenciación osteoblástica, con afinidad de unirse a los receptores LRP5 o 6, para igualmente formar un complejo, este complejo, el cual no va a permitir que las moléculas Wnts activadoras se unan a este receptor, sin embargo no internaliza el receptor como tal, sino que impide la formación de la cascada intracelular para la acumulación citoplasmática de b catenina y así mismo su translocación nuclear (*Xiao et al.; 2011*). En nuestro estudio se encontró que el 69,43% de los individuos de la población incluida presentan el SNP SOST rs6503475. Siendo el 51,59% SNP heterocigoto, el 17,83% homocigoto y 30,57% genotipo nativo.

Se han definido genotipos de SOST rs6503475, donde el genotipo ancestral se ha descrito como AA, que también ha sido reportado en la literatura al igual que los SNP anteriores con sus complementarios, se ha descrito la variante para este SNP como AG que sería la variante heterocigoto, y GG que corresponde a la variante homocigota (*Mil genomas.; ncbi*).

En el estudio realizado en población de Antioquia, donde se incluyeron 94 individuos y se reportaron 188 alelos estudiados, se reportaron frecuencias alélicas en población sana para el SNP SOST rs6503475, donde se reportó una frecuencia alélica de 45,21%; que representa el 0,4521; para la variante G (*Mil genomas.; ncbi*); siendo similar a la frecuencia alélica encontrada por nosotros que corresponde a un 43,63%; que representa el 0,4363. Igualmente en población

antioqueña se reportó una frecuencia alélica de 54,79%; que corresponde a 0,5479; para el alelo ancestral A, similar nuevamente a la frecuencia alélica encontrada por nosotros que corresponde a 56,36%; que corresponde a 0,5636 (*Mil genomas.; ncbi*).

Igualmente, se encontró en nuestra población que 177 alelos que corresponden a 0,56 representan el alelo ancestral A, y 137 alelos que corresponden al 0,44 representan el alelo variante G. Que concuerda con lo reportado en población de Antioquia, donde se encontró que el 0,4521 representaba el alelo variante G, y el 0,5479 representaba el alelo ancestral A (*Mil genomas.; ncbi*).

En nuestro estudio no se encontró ningún resultado significativo de este polimorfismo y el diagnóstico periodontal, sin embargo, tanto en el grupo con EP (50%) y el grupo sin EP (53,7%) se presentó mayor frecuencia para el SNP heterocigoto. Tampoco obtuvimos ningún resultado significativo en cuanto a la severidad de la EP.

Aun así este SNP ha sido estudiado en AR, Rooy et al.; [2012], en su estudio reporta que SNP SOST rs653475 se asoció con progresión de daño articular a bajo grado en pacientes con diagnóstico de AR *(Rooy et al.; 2012).* Este SNP SOST rs653475 se presentó asociado a otros SNP como DKK 368, 367 o KREMEN, como hallazgo en nuestro estudio; sin embargo al realizar el valor p ajustado, no se reportó ningún hallazgo significativo debido al tamaño reducido de la población. No se encontraron reportes previos de este polimorfismo relacionados con la presencia de EP o su severidad.

Otras formas de evaluación de la proteína SOST han sido tomadas en cuenta en relación con EP, un estudio realizado por Taut et al, que evaluaron el efecto en ratas de anticuerpos anti SOST; en un modelo murino, al cual se le indujo periodontitis con patógenos periodontales como *P. gingivalis*, los cuales presentaron una perdida alveolar severa en un lapso rápido de tiempo; los anticuerpos anti esclerostina se aplicaron 4 semanas después de inducida la EP en los ratones, a las 3 semanas de haber aplicado los anticuerpos sistémicos, se notó la mejoría clínica de la EP inducida, revirtiendo la pérdida ósea y aumentando los niveles óseos corroborados con medidas clínicas y radiografías, con significancia estadística; sin embargo se requieren estudios muchos más elaborados y más investigaciones en EP para saber si la administración de estos anticuerpos realmente revierten el daño ósea inducido por la EP (*Taut et al.; 2013*).

En cuanto a LRP, el cual es un complejo de proteína relacionada a ligando (LRP). Encargados de ensamblar una respuesta intracelular donde participan varios componentes como el regulador B-catenina, que aumenta al haber interacción con los receptores de membrana, esta a su vez interactúa con factores de transcripción nucleares (*Logan et al.; 2004; Rivera et al.; 2006*). Estos receptores tiene afinidad con ligandos activadores (Wnt-5,10), para desencadenar el ensamblaje de la vía intracelular que inhibe la degradación proteosómica de la b-catenina, permitiendo que se dé su translocación nuclear (*Xiao et al.; 2011*). En nuestro estudio se encontró una frecuencias para SNP LRP5 rs3736228 de 21%, siendo el 5% homocigoto, y el 15,9% heterocigoto.

Se han definido genotipos de LRP rs3736228, donde el genotipo ancestral se ha descrito como CC, que también ha sido reportado en la literatura al igual que los SNP anteriores con sus complementarios, se ha descrito la variante para este SNP como CT que sería la variante heterocigoto, y TT que corresponde a la variante homocigota (*Mil genomas.; ncbi*).

En el estudio realizado en población de Antioquia, donde se incluyeron 94 individuos y se reportaron 188 alelos estudiados, se reportaron frecuencias alélicas en población sana para el SNP LRP rs3736228, donde se reportó una frecuencia alélica de 15,43%; que representa el 0,1543; para la variante T (*Mil genomas.; ncbi*); siendo más baja en comparación con la frecuencia alélica encontrada por nosotros que corresponde a un 21,01%; que representa el 0,2101. Igualmente en población antioqueña se reportó una frecuencia alélica de 84,57%; que corresponde a 0,8757; para el alelo ancestral C, en comparación a la frecuencia alélica encontrada por nosotros que corresponde a 78,98%; que corresponde a 0,7898 para este alelo (*Mil genomas.; ncbi*).

Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de SNPs se han descrito en relación con enfermedades sistémicas inflamatorias como la AR. WESTENDORF et al,; [2004], reportó que la presencia de polimorfismos genéticos SNPs para LRP5, específicamente el LRP5 rs3736228, se presentaba en enfermedades de alteraciones óseas como AR y osteoporosis, presentando una densidad ósea deficiente y un proceso de resorción con destrucción crónica (*Westendorf et al.; 2004).*

Rooy et al.; [2012]; en una cohorte de 1418 pacientes con diagnóstico de AR; mostró que el SNP de LRP5 3736228 se asoció con progresión de AR corroborada con radiografías; sin embargo concluyo que no se podía relacionar con el daño articular. En comparación con lo encontrado en

nuestro estudio, donde este SNP no tuvo asociación con los parámetros de evaluación periodontal, ni diagnostico periodontal, incluso cuando se evaluaron las frecuencias genotípicas y alélicas, no se encontró ninguna asociación con los parámetros evaluados en nuestro estudio.

En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas entre tener alguno de los SNPs anteriormente informados (DKK rs1896368, DKK rs1896367, DKK rs1528873, SOST rs6503475, KREMEN rs132274) con la presencia de *P.gingivalis* o anti *P.gingivalis* en individuos sanos; lo que concuerda con Cardona et al,; [2018] , donde no se observaron diferencia en estos dos parámetros en 63 pacientes con AR en estados tempranos de la enfermedad y controles sanos, aunque en este estudio solo se evaluaron SNP relacionados DKK (*Cardona et al.; 2018*).

Cardona et al; [2018], en un estudio realizado en 63 pacientes con AR temprana, observaron asociaciones de polimorfismos rs1896367 y rs1896368 con variables periodontales, como el diagnóstico de EP y el número de dientes perdidos. Es importante tener en cuenta que, según nuestro mejor conocimiento, este es el primer estudio que investiga una asociación entre los polimorfismos de DKK-1 y las variables periodontales, generando la presencia de los SNP de la vía Wnt podrían afectar los resultados periodontales (*Cardona et al.; 2018*). Estos hallazgos concuerdan en nuestro estudio en cuanto a los resultados encontrados para DKK rs1896368, donde se encontró que para el parámetro CAL evaluado se encontraron mayor cantidad de sitios con CAL de 2 a 5 mm, en los individuos que presentaban el SNP.

Sin embargo, en contraste de los resultados encontrados por Cardona et al.; [2018], donde se encontró que el SNP DKK rs1869367 se asoció con el daño articular en pacientes con AR temprana (*Cardona et al.; 2018*); en nuestro estudio se observó que los individuos que presentaron el SNP DKK rs1869367, al igual que aquellos que presentaron el SNP KREMEN rs132274; presentaron menos sitios con CAL de 2 a 5mm; al igual que los individuos que presentaron el alelo variante para DKK rs1869367 y KREMEN rs1322274.

En resumen, en nuestro estudio el SNP DKK rs1896368 se presentó en el 85,6% de los individuos asociándose con diagnóstico de EP. Al analizar este mismo SNP por la severidad, encontramos que el 100% de los individuos que presentaban este SNP tenían diagnóstico de EP severa, el 82,2% moderada, lo cual nos llevaría pensar que podría llegar a influir en la severidad de la EP.

Igualmente encontramos que tanto el alelo como el genotipo del SNP DKK rs1896367 en nuestro estudio presento una frecuencia mayor en el grupo sin EP que corresponde a un 67,2%, son una diferencia significativa, siendo en su mayoría heterocigoto; y similarmente, el polimorfismo para KREMEN rs132274, demuestro una frecuencia mayor en los individuos sin EP de 82,1%, con una diferencia significativa lo cual podría permitirnos pensar en que podrían llegar a tener un impacto protector en los individuos que los portan para EP, para lo cual se debe ampliar y diseñar estudios prospectivos.

11. CONCLUSIONES

En primera instancia, se encontró que el SNP DKK rs1896367, fue más frecuente en el grupo sin EP con un 67,2% en comparación con un 46,7% en el grupo con EP. La forma heterocigótica de este SNP fue la más frecuente, y ninguno de los individuos con EP severa presento forma homocigótica, lo que nos llevaría a pensar que la presencia de este SNP en individuos sistémicamente sanos podría ser un factor protector para la pérdida ósea en EP.

En nuestro estudio, se encontró al analizar las frecuencias alélicas para el SNP DKK rs1896367, donde en los individuos que presentaban el alelo ancestral G presentaron una mediana 16,07(3,57-32,62) de sitios con CAL mayor o igual a 3 mm; la cual fue mayor a la encontrada en los individuos con el alelo variante A. En cuanto al análisis de la severidad de EP, se encontró una tendencia en el grupo de individuos que presento EP severa donde se encontraron 23 (10,8%) alelos ancestrales G, a diferencia de 7 (7%) alelos de la variante A, lo que llevaría a pensar que tener el alelo ancestral está relacionado con la presencia y severidad de la EP.

Otro SNP con un comportamiento similar fue KREMEN rs132274, donde encontramos una frecuencia alta de este SNP en los individuos sin EP que corresponde al 82,1%, en comparación con un 24,4% con diagnóstico de EP; siendo predominante la forma heterocigota. Por lo cual podemos suponer que debido a su alta presencia en individuos sin EP, podría llegar a ser un factor protector en individuos sistémicamente sanos.

Igualmente, al analizar las frecuencias alélicas de KREMEN rs132274, se encontró que la mediana de sitios con CAL total fue mayor en los individuos que presentaban el alelo ancestral C, que el alelo variante T, siendo esta de 50,57(18,19- 78,49). Se puede concluir que La presencia de alelo variante T para KREMEN rs132274 se asocia con la ausencia de EP.

De otra forma, un hallazgo muy interesante es el que se obtuvo en este estudio piloto, para el SNP DKK rs1896368, donde se encontró que el 85,6% de los individuos con el SNP presentaron EP, con una significancia estadística. De los 15 individuos con EP severa todos lo presentaron. La forma heterocigótica fue la más frecuente asociándose a las formas más severas. Lo que podría inferir que la presencia de este SNP en los individuos sanos podría estar relacionada con la

severidad de la pérdida ósea que caracteriza la EP; y que se podría partir de esta hipótesis para generar más estudios que la respalden.

Otro hallazgo importante que se obtuvo al analizar la frecuencias alélicas en nuestro estudio fue para el SNP DKK rs1896368, donde se encontró que de los 314 alelos analizados de nuestra población, se encontró una mediana de 16,67 (4,94-33,33) de sitios con una CAL mayor o igual a 3 mm en individuos que presentaban el alelo variante G; la cual fue mayor que la encontrada para los individuos que presentaban el alelo ancestral A, donde se obtuvo una mediana de 10,75 (0,60-26,85) de sitios con CAL mayor o igual a 3. En cuanto al análisis de la severidad de EP, se encontró una tendencia en el grupo de individuos que presento EP severa donde se encontraron 7 (5,2%) alelos ancestrales A, a diferencia de 23 (12,7%) alelos de la variante G, lo que llevaría pensar que la presencia del alelo variante está asociado con la presencia y severidad de la EP.

Por lo que podríamos concluir, que tal vez esta vía de metabolismo óseo podría tener un papel importante en el desarrollo y la severidad de la EP en nuestra población; sin embargo son necesarios muchos más estudios que puedan confirmar y respaldar este primer acercamiento.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 1990; 215:403-410.

Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. Periodontology 2000. 2004; *34(1):, 9-21*.

Bahekar AA, Singh S, Saha S, Molnar J, Arora R. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. American heart journal. 2007; 154(5): 830-837.

Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. Periodontology 2000. 2010; 53(1): 55-69.

Bello- Gualtero JM, Lafaurie GI, Hoyos LX, Castillo DM, De- Avila, J, Munevar, JC, Romero- Sánchez C. Periodontal Disease in Individuals With a Genetic Risk of Developing Arthritis and Early Rheumatoid Arthritis: A Cross- Sectional Study. Journal of periodontology. 2016; 87(4): 346-356.

Bostanci N, Belibasakis GN. Porphyromonas gingivalis: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. FEMS microbiology letters. 2012; 333(1): 1-9.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature 2003; 423: 337–342.

Cardona-Rincón A, Acevedo-Godoy M, Perdomo-Lara S, et al. AB0001 Association of dickkopf1–1 polymorphisms with radiological damage and periodontal disease in patients with early rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases. 2018; 77:1206.

Crotti, T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, Haynes D. Receptor activator NF κB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. Journal of periodontal research. 2003; 38(4): 380-387.

de Rooy DPC, Yeremenko NG, Wilson AG, et al. Genetic studies on components of the Wnt signalling pathway and the severity of joint destruction in rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases 2013; 72:769-775.

Eke P, Page R, Wei L, Thornton-Evans G, Genco R. Update of the Case Definitions for Population-Based Surveillance of Periodontitis. Journal of Periodontology. 2012; 83(12): 1449-1454.

Gao H, Tian Y, Meng H, Hou J, Xu L, Zhang L, Chen Z. Associations of apolipoprotein E and low- density lipoprotein receptor- related protein 5 polymorphisms with dyslipidemia and generalized aggressive periodontitis in a Chinese population. Journal of periodontal research. 2015; 50(4): 509-518.

Glass DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Karsenty G. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. Developmental cell. 2005; 8(5): 751-764.

Godoy MA, Cardona AD, Perdomo-Lara SJ, Chila LM, Molano WB, Chalem P, et al. Genotypic and haplotypic frequencies of Dickkopf-1 gene polymorphisms in patients with early rheumatoid arthritis compared to healthy Colombian controls. Universidad Nacional de Colombia 2018.

Hansen GM, Egeberg A, Holmstrup P, Hansen PR. Relation of periodontitis to risk of cardiovascular and all-cause mortality (from a Danish nationwide cohort study). American Journal of Cardiology. 2016; 118(4): 489-493

Hartikka H, Mäkitie O, Männikkö M, Doria AS, Daneman A, Cole WG, Sochett EB. Heterozygous mutations in the LDL receptor- related protein 5 (LRP5) gene are associated with primary osteoporosis in children. Journal of bone and mineral research. 2005; 20(5): 783-789.

Heredia AM, Giraldo-Quintero S, De Avila J, Chila L, Lafaurie G, Rodriguez C, et al. Could Increase Levels of Dickkopf-1 Protein be Considered as a Potential Biomarker for Bone Resorption in Joint and Periodontal Disease in Patients with Early Rheumatoid Arthritis? Arthritis Rheumatol. 2016; 68 (suppl 10).

PubMed [base de datos en Internet]. 2013- [fecha de acceso 4 de octubre de 2018]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/

Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. Gaceta Sanitaria. 2005; 19(4): 333-341.

Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. Periodontology 2000. 2001; 25(1): 8-20.

Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. Critical Reviews in Oral biology and medicine. 2003; 14 (6): 430-449.

Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. The Journal of clinical investigation. 2006; 116(5): 1202-1209.

Liu YCG, Lerner UH, Teng, YTA. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. Periodontology 2000. 2010; 52(1): 163-206.

Löe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. Acta odontologica scandinavica. 1963; 21(6): 533-551.

Logan, CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2004; 20: 781-810.

Manolagas SC. Wnt signaling and osteoporosis. Maturitas. 2014; 78(3); 233-237.

Mercado FB, Marshall RI, Klestov AC, Bartold PM. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. Journal of periodontology. 2001; 72(6): 779-787.

Miao CG, Yang YY, He X, Li XF, Huang C, Huang, Y, et al. Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. Cellular signaling. 2013; 25(10): 2069-2078.

Miceli-Richard C, Taylor KE, Nititham J, et al. Genetic contribution of DKK-1 polymorphisms to RA structural severity and DKK-1 level of expression. Annals of the Rheumatic Diseases. 2015; 74:1480-1481.

Mil genomas; ncbi. *https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/*

Napimoga MH, Nametala C, Silva FL, Miranda TS, Bossonaro JP, et al. Involvement of the Wnt- β- catenin signalling antagonists, sclerostin and dickkopf- related protein 1, in chronic periodontitis. Journal of clinical periodontology. 2014; 41(6): 550-557.

Pandolfo M. Friedreich's ataxia: clinical aspects and pathogenesis. Semin Neurol. 1999; 19:311-21.

Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, et al. 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. 2018; 89: S173-S182.

PERIODONTITIS, O. American Academy of Periodontology Task Force report on the update to the 1999 classification of periodontal diseases and conditions. J Periodontol. 2015.

Porta, M. The genome sequence is a jazz score. International Journal of Epidemiology. 2003; 32(1): 29-31.

RF TEST, ref. 1107105 Spinreact, Santa Coloma, Spain. 2017.

Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. The Lancet. 2008; 371(9623): 1505-1512.

Rivera J, Alegre C, Ballina FJ, Carbonell J, Carmona L, et al. Documento de consenso de la Sociedad Española de Reumatología sobre la fibromialgia. Reumatología clínica. 2006; 2: S55-S66.

Romero-Sánchez C, Malagón C, Vargas C, Fernanda Torres M, Moreno, et al. Porphyromonas Gingivalis and IgG1 and IgG2 Subclass Antibodies in Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis. Journal of Dentistry for Children. 2017; 84(2): 72-79.

Rossini M, Gatti D, Adami S. Involvement of WNT/β-catenin signaling in the treatment of osteoporosis. Calcified tissue international. 2013; 93(2): 121-132.

Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. Journal of Molecular Biology. 1975; 94(3): 441–448.

Sen M, Chamorro M, Reifert J, Corr M, Carson DA. Blockade of Wnt- 5A/Frizzled 5 signaling inhibits rheumatoid synoviocyte activation. Arthritis & Rheumatology. 2001; 44(4): 772-781.

Sharma G, Sharma AR, Seo EM, Nam JS. Genetic polymorphism in extracellular regulators of Wnt signaling pathway. BioMed research international. 2015.

Sirota M, Schaub MA, Batzoglou S, Robinson WH, Butte AJ. Autoimmune disease classification by inverse association with SNP alleles. PLoS genetics. 2009; 5(12): e1000792.

Soland MA, Bouvet BR, Arriaga S, Almará A. Polimorfismo genético de la lipoprotein lipasa e hipertrigliceridemia en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Av Diabetol. 2008; 24: 231-236.

Tatakis DN, Kumar PS. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. Dental Clinics. 2005; 49(3), 491-516.

Taut AD, Jin Q, Chung JH, Galindo-Moreno P, Yi ES, Sugai JV, et al. Sclerostin antibody stimulates bone regeneration after experimental periodontitis. Journal of Bone and Mineral Research. 2013; 28(11): 2347–2356. DOI:10.1002/jbmr.1984.

Tonetti M.S., Greenwell H., Kornman, K.S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. Journal of periodontology,. 2018; 89: 59-72.

Test 1 THL Ali-FAX®Polverara (PD)-Italy

Unriza-Puin S, Bautista-Molano W, Lafaurie G I, Valle-Oñate, R, Chalem P, Chila-Moreno L, et al. Are obesity, ACPAs and periodontitis conditions that influence the risk of developing rheumatoid arthritis in first-degree relatives?. Clinical rheumatology. 2017; 36(4): 799-806.

Van Steenbergen HW, Van Nies JA, Ruyssen-Witrand A, Huizinga TWJ. Cantagrel A, Berenbaum F et al. IL2RA is associated with persistence of rheumatoid arthritis. Arthritis research & therapy. 2015; 17(1): 244.

Velasco J, Riancho JA. La vía Wnt y el hueso. Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas. 2008; 17(1): 5-9.

Walsh NC, Gravallese EM. Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance. Immunological reviews. 2010; 233(1): 301-312.

Wang SY, Liu YY, Ye H, Guo JP, Li R, Liu X, et al. Circulating Dickkopf-1 is correlated with bone erosion and inflammation in rheumatoid arthritis. The Journal of rheumatology, jrheum-100089. 2011.

Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. Gene. 2004; 341: 19-39.

Xiao CY, Pan YF, Guo XH, Wu YQ, Gu JR, Cai DZ. Expression of β-catenin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. Scandinavian journal of rheumatology. 2011; 40(1): 26-33.

13. ANEXOS

13.1. *Formatos de criterios de exclusión*

Fecha: _____ Género: F M Edad: _____
Nombre: _____ C.C: _____ Procedencia: _____

Paciente con proceso infeccioso en curso	SI__	NO__
Paciente con diagnóstico de otra enfermedad autoinmune.	SI__	NO__
Pacientes que rehúsen entrar al estudio o cuyos padres no autoricen el ingreso al mismo	SI__	NO__
Recibió tratamiento periodontal en los últimos seis meses	SI__	NO__
Consumió Antibióticos en los últimos 3 meses	SI__	NO__
Paciente en lactancia o embarazo	SI__	NO__
Paciente con ortodoncia	SI__	NO__
Paciente con cáncer	SI__	NO__
Paciente con Diabetes	SI__	NO__
Pacientes con número de dientes menor de 6	SI__	NO__
Paciente reconoce porque perdió sus dientes	SI__	NO__

ACEPTADO SI NO

_____ _____
NOMBRE EXAMINADOR **FIRMA**

Observaciones:_____

DATOS EPIDEMIOLOGICOS COMPLEMENTARIOS:

1. **Tipo de Vivienda** Propia:____ Arrendada:____ Común:____ Alojamiento:____
2. **Estado Civil** Casado:____ Soltero:____ Viudo:____ Unión libre:____
3. **Nivel de estudios** Primaria:____ Bachillerato:____ Universitario:____
4. **Actividad económica** Hogar:____ Independiente:____ Empleado dependiente:____ Pensionado:____ Estudiante:____
5. **Actividad física** SI:____ NO:____ Leve:____ Moderada:____ Excesiva:____
6. **Talla**:_____ **Peso:**_____
7. **Paciente con exposición actual a cigarrillo. Cuantos diarios:**_____ SI__ NO__
8. **Paciente con exposición pasada a cigarrillo. Hace cuánto:**_____ SI__ NO__
9. **Paciente fumador pasivo. Hace cuánto:**_____ SI__ NO__

13.2. Formatos de recolección de datos

Fecha:_____Número._____

Nombre:_____cédula:_____

Edad(años):_____Sexo: M_____F_____

Diagnóstico: Pre AR_____**Clínica**_____**Familiar de AR**_____ **Nombre del** familiar con AR_____

AR temprana:_____

Otros diagnósticos o comorbilidades:_____

Tratamiento actual:_____ toma bifosfonatos_____corticoide: _____ dosis: _____ otros_____

Fuma: SI___**NO**___ Fumó:SI_____NO:_____Hace cuanto_____fumador pasivo:_____ Hace cuánto:_____

Edad al Dx de la AR:_____ tiempo de diagnóstico:_____

ocupación:_____ Tipo de vivienda:_____Estado civil_____Nivel de estudio_____

Actividad Fisica: Leve_____Moderada_____Fuerte_____

TTo biológico previo_____DMARD previo_____

Articulaciones inflamadas_____articulaciones dolorosas_____

VAS pte_____VAS del médico_____SCDAI_____RAPID 3_____

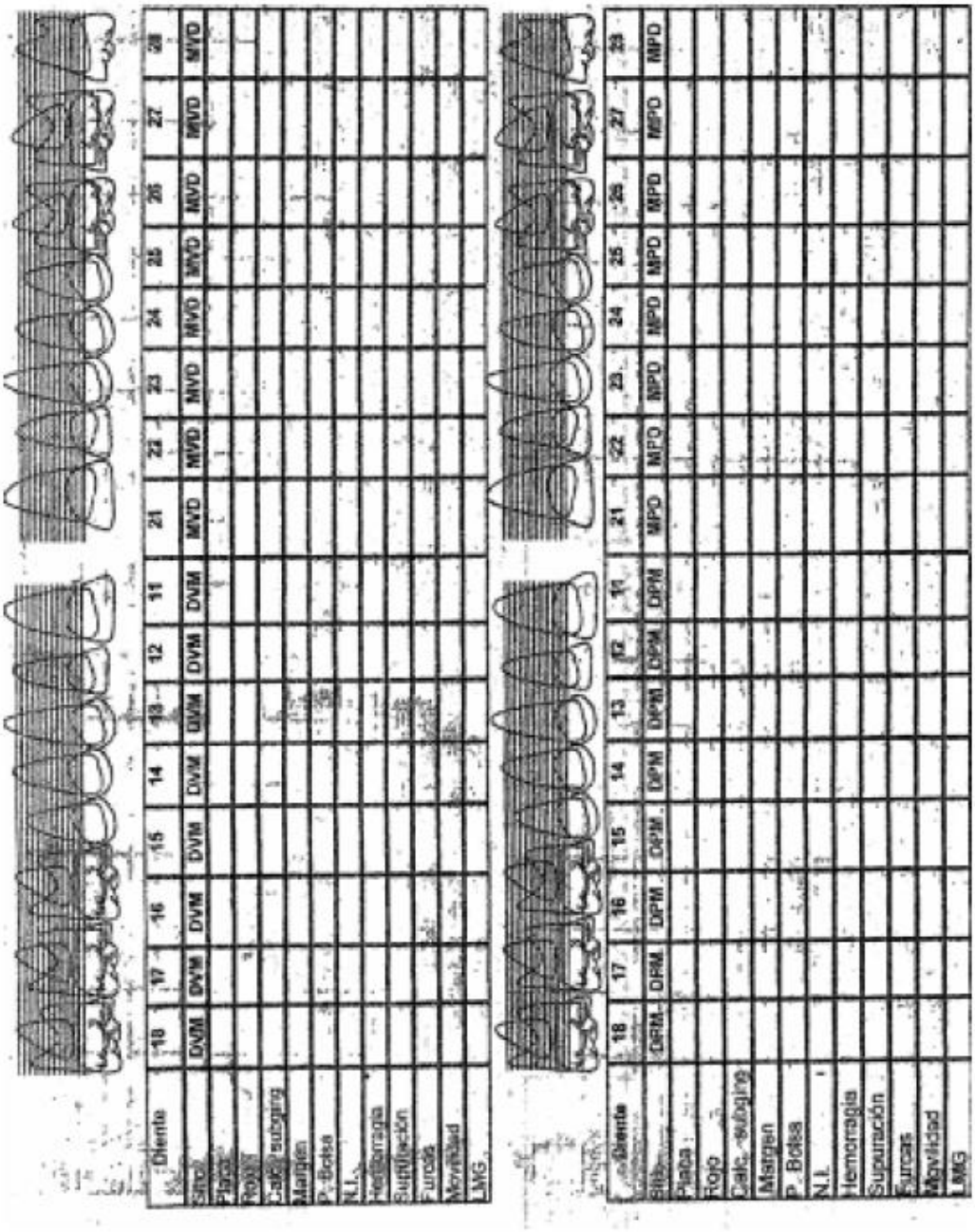
HAQ_____DAS28_____VSG_____ PCru:_____

Peso_____talla-estatura_____IMC_____

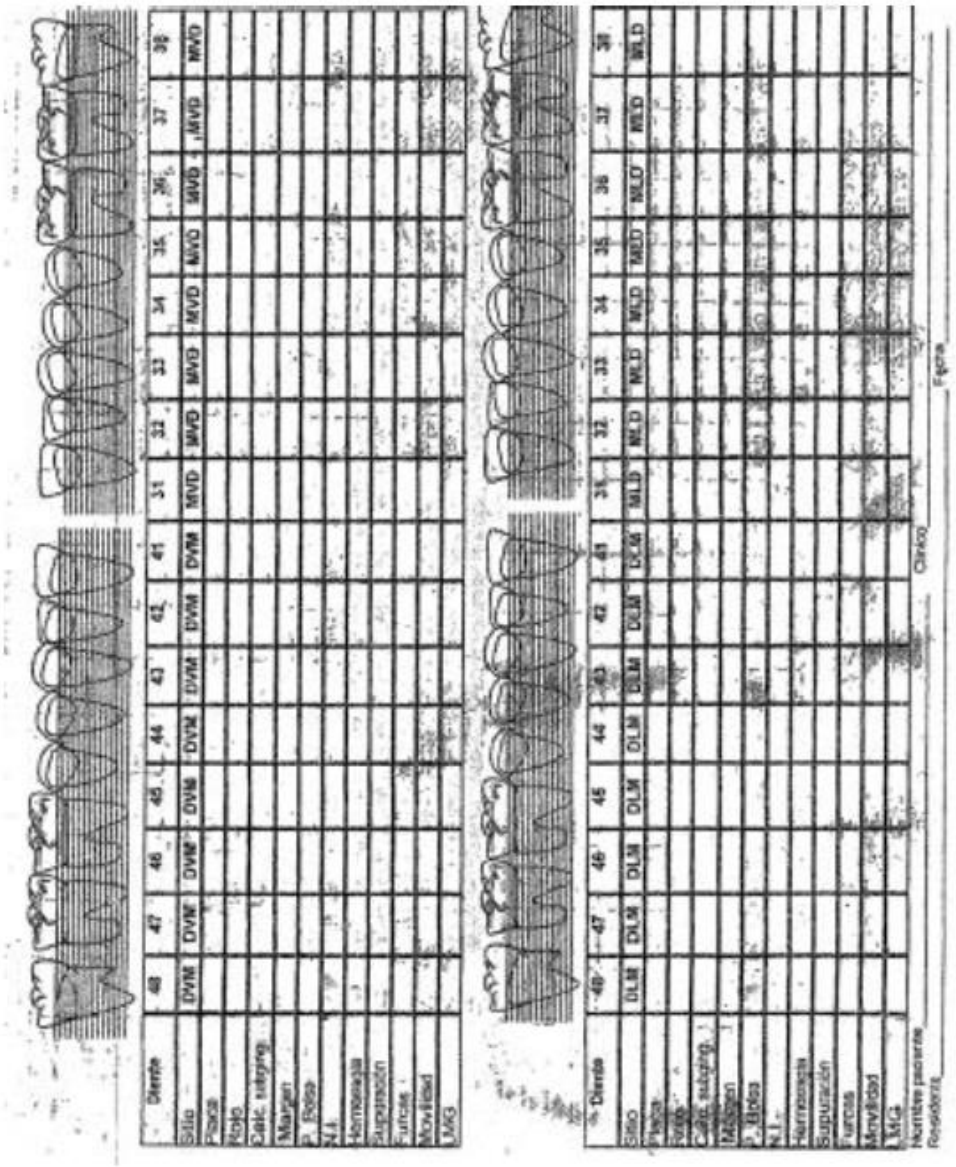
Índice cintura / cadera_____

Responsable_____

13.3. Formato de periodontograma



Periodontograma (continuación)



13.4. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

AUTORIZACIÓN PARA EL USO DE LA MUESTRA DE SANGRE Y DE LA ENCIA PARA UN TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN PACIENTES CON ARTRITIS.

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Ma. Consuelo Romero Sánchez, MSc, PhD Teléfono: 633-1368 ext 1291 Universidad El Bosque/ Hospital Militar, celular 3127771226

CO-INVESTIGADORES RESPONSABLES POR UNIVERSIDAD PARTICIPANTE:

Rafael Valle Médico Reumatólogo. Hospital Militar Central Cel.3153527618

Juan Manuel Bello Médico Reumatólogo. Hospital Militar Central Cel. 3208094232

Gloria Inés Lafaurie Odontóloga Periodoncista, Universidad El Bosque. Cel.3145247480

Wilson A. Bautista M Reumatólogo – Universidad Militar Nueva Granada Cel. 313 496 4245

Lorena Chila Moreno Bacterióloga- UIBO-Universidad El Bosque Cel. 3142997736

Juliette De Avila Bacterióloga- UIBO-Universidad El Bosque Cel. 301 4433083

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: Asociación de marcadores óseos y anticuerpos anti carbamilados y su relación con índices periodontales y de actividad reumatológica en pacientes con AR temprana y en familiares en primer grado de pacientes con AR

El presente es un formato de aceptación para que mi muestra sea usada en un estudio sobre artritis. El término artritis agrupan a una serie de enfermedades que tienen como principal manifestación la inflamación de las articulaciones de la columna y en algunos casos de las manos, muñecas y codos, Se cree que infecciones en la boca pueden estar relacionadas con estas enfermedades . Por lo tanto la muestra tomada de sangre y de su encía será estudiada para ver el contenido de sustancias y microorganismos que pueden ayudar a controlar y entender estas enfermedades.

Conozco que para el manejo actual correcto como paciente con artritis o de familiar de un paciente con artritis, es importante que tomen muestras de sangre y de la encía , por lo tanto autorizo para que una parte de la muestra sea usada en el estudio y en otros estudios que se deriven de esta investigación.

El protocolo de investigación consistirá en la consulta normal con un reumatólogo y además se le hará un examen en la boca por un odontólogo especializado quien le tomara las medidas de sus

encías, y las muestras de las bacterias que están debajo de sus encías y la toma de muestras de sangre será realizada por una bacterióloga para confirmar el estado de defensas de su organismo.

Muestras de placa bacteriana y líquido crevicular: Las muestras de la placa dental al igual que el líquido se encuentra debajo de las encías serán tomadas en varias áreas de su boca usando instrumentos dentales estériles para identificar una de las bacterias que generan enfermedad en sus encías. El procedimiento para tomar las muestras es similar a una limpieza dental y tomara una pequeña muestra de la placa dental y de líquido crevicular introduciendo una puntas de papel absorbente especializadas para esta toma. Este procedimiento no es doloroso, algunas veces se siente una pequeña molestia.

Toma de sangre. Serán tomadas el mismo día las muestras de sangre cada una por una persona experta de manera similar a una muestra de sangre que se toma de rutina.

COMPENSACIÓN: Usted no recibirá dinero por participar en el estudio. pero mi ayuda en el futuro podría beneficiar a los pacientes con artritis, al obtenerse resultados científicos y saber si las infecciones de la boca pueden afectar la enfermedad.Los costos del examen microbiológico y el examen de sangre para evaluar sus defensas serán cubiertos por el estudio. Otros procedimientos para tratar la enfermedad que se realizaran posteriormente no serán cubiertos.

RIESGOS: Usted debe entender que los riesgos de estos procedimientos serán mínimos. Las medidas clínicas serán similares a las que se realizan en una clínica dental. La toma de muestras por debajo de las encías es similar a los procedimientos que se realizan durante una limpieza dental, por lo tanto son de riesgo mínimo. Personal profesional con experiencia realizará todos estos procedimientos utilizando medidas de seguridad estandarizadas. Estos incluyen el uso de ropa protectora (blusas de laboratorio), guantes, tapabocas y gafas protectoras. Además todos los instrumentos serán esterilizados entre pacientes, y cuando es necesario materiales desechables serán utilizados y la toma de sangre no representará ningún riesgo para usted ya que el volumen tomado corresponde a una mínima parte de la sangre comparado con la que se extrae cuando usted hace una donación de sangre. Después de la toma de sangre usted puede sentir un poco de dolor en el sitio y podría aparecer un morado en la piel que desaparecerá en unos días. La toma de líquido sinovial solo se realizará en caso de indicación médica con todo el protocolo de antisepsia.

BENEFICIOS: El mayor beneficio que usted obtiene es el examen para identificar los algunos de los microorganismos que se pueden relacionan con el aflojamiento de los dientes. El odontólogo examinador le explicará las causas que producen las enfermedades de las encías y que medidas son

necesarias para controlar o prevenir esta infección que puede estar o no en su boca. La información obtenida de este estudio será muy importante para establecer el tipo de bacterias que pueden causar la afección de sus encías y necesita tratamiento a seguir para el control de sus encías. También se le harán exámenes de sangre para evaluar el estado en que se encuentran sus defensas y la actividad de su artritis.

CONFIDENCIALIDAD: Usted debe entender que toda la información obtenida en este estudio se mantendrá estrictamente confidencial, con la excepción de que la Ley requiera la información. Si existe alguna publicación como resultado de este estudio, usted no será identificado por su nombre.

COMPLICACIONES: Usted debe recordar que la posibilidad de complicaciones por su participación en este estudio es muy baja. Si usted tiene alguna complicación usted puede llamar a los números de teléfono celulares de los investigadores encargados en cada universidad que aparecen al inicio de este documento, ellos lo orientarán y le proporcionarán la información necesaria para su solución.

RETIRO DEL ESTUDIO: Usted está de acuerdo en que su participación en este estudio es completamente voluntaria y que puede retirarse del mismo en cualquier momento avisando con tiempo a los investigadores. Esta decisión no lo afectará en el presente o futuro. Es posible que alguno de los investigadores pueda retirarlo del estudio si es necesario al encontrar alguna situación que lo requiera para su beneficio.

DERECHOS DE LA PERSONA: A usted se le ha dado la oportunidad de preguntar acerca de este estudio y de su participación en él. Tiene derecho a que sus preguntas se respondan a su completa satisfacción. Usted debe hacer sus preguntas ahora antes de firmar este documento o en cualquier momento después de firmarlo. Si usted desea alguna otra información o tiene preguntas acerca de los derechos de una persona que participa en investigación, puede contactar a los investigadores encargados en cada Universidad en cualquier momento a los números de teléfono que se encuentran en la parte inicial del documento. No habrá subordinación en los pacientes de las fuerzas militares

ACUERDO: Yo he leído y entendido este informe de consentimiento. Estoy de acuerdo en que voy a participar en este estudio de investigación. Cuando firme este documento recibiré una copia de este informe de consentimiento.