



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA**

**DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE CITOQUINAS Y  
ASOCIACIÓN CON PARÁMETROS PERIODONTALES EN PACIENTES CON  
SÍNDROME DE DOWN.**

**Constanza Belén Tapia Naím**

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

**TUTOR PRINCIPAL  
Prof. Dr. Jaime Diaz Zúñiga.**

**TUTORES ASOCIADOS  
Prof. Samanta Melgar Rodríguez.  
Prof. Dr. Víctor Martínez Aguilar.**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA**

**DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE CITOQUINAS Y  
ASOCIACIÓN CON PARÁMETROS PERIODONTALES EN PACIENTES CON  
SÍNDROME DE DOWN.**

**Constanza Belén Tapia Naím**

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

**TUTOR PRINCIPAL  
Prof. Dr. Jaime Diaz Zúñiga.**

**TUTORES ASOCIADOS  
Prof. Samanta Melgar Rodríguez.  
Prof. Dr. Víctor Martínez Aguilar.**

Adscrito a proyectos **FIOUCh C19-04, RDP-IADR 2021-2023**

## **Dedicatoria**

*A mi querido hermano, tu tranquilidad y fuerza ante la adversidad me inspiran día a día.*

## **Agradecimientos**

A mi madre y padre, sin ellos no podría estar escribiendo esto hoy, gracias por guiarme por el camino correcto desde pequeña.

A mi perrito Luke, por mirarme como lo hace y sacarme una sonrisa, y a mi gata Taelia, que prometió acompañarme hasta terminar esta etapa de mi vida y ser una profesional.

A todos mis amigos que compartieron risas conmigo, que siempre vieron en mí un potencial y estuvieron cuando más lo necesitaba, gracias por confiar en mí.

Gracias en especial a Juan Pablo, que me animó a terminar esto, y me escuchó quejarme todas las veces que fueran necesarias; gracias a Felipe y sus llamadas, tu amistad fue un regalo que me entregó la universidad.

Especial agradecimientos a mi tutor de tesis Dr. Jaime Diaz Zúñiga por guiarme en este trabajo de investigación, por compartir sus conocimientos conmigo y su gran entrega a la docencia. Gracias a todos los revisores por dedicar su tiempo en este trabajo, a la profesora Samanta Melgar Rodríguez y al Dr. Víctor Martínez Aguilar y su experticia en el interesante mundo de los polimorfismos.

## Índice

1. Introducción	1
2. Marco teórico	4
2.1. Salud periodontal en pacientes con SD	4
2.2. Patogenia de la periodontitis	4
2.3. Mediadores pro-inflamatorios en SD	5
2.4. Citoquinas pro-inflamatorias en SD	6
2.4.1. Citoquina IL-1	7
2.4.2. Citoquina IL-6	7
2.4.3. Ligando 5 de quimioquina CCL5 y Receptor de quimioquina C-C (CCR)5	8
2.4.4. Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	9
2.5. Planteamiento del Problema	10
3. Hipótesis	13
4. Objetivo general	13
5. Objetivos específicos	13
6. Materiales y métodos	14
6.1. Tipo de estudio	14
6.2. Población de estudio, muestreo y criterios de elegibilidad	14
6.3. Examen periodontal	14
6.4. Obtención de muestras de fluido crevicular gingival y saliva	15
6.5. Cuantificación de proteínas	16
6.6. Detección de polimorfismos	17
6.7. Equilibrio de Hardy-Weinberg	18
6.8. Análisis de los datos	18
7. Resultados	20
7.1. Evaluación del estado periodontal	20
7.2. Cuantificación de los mediadores en FCG	22
7.3. Identificación de los polimorfismos	23
8. Discusión	34
9. Conclusiones	40
10. Referencias Bibliográficas	41

11. Anexos	50
11.1. Anexo N°1	50
11.2. Anexo N°2	51
11.3. Anexo N°3	52
11.4. Anexo N°4	53

## Resumen

**Introducción.** El síndrome de Down (SD) es la condición congénita multisistémica más común a nivel mundial incluyendo alteraciones físicas y del comportamiento. Muchos pacientes presentan diversos problemas de salud, entre ellos desbalances inmunológicos importantes. Diversas manifestaciones craneofaciales y bucales han sido descritas en la literatura, dentro de las patologías bucales más prevalentes, la enfermedad periodontal es una de las asociadas con este síndrome, caracterizada por una aparición temprana y de rápida progresión. Los factores previamente investigados incluyeron déficit cognitivo, composición de la placa subgingival, respuestas inmunes/inflamatorias, entre otras. El propósito de esta investigación es detectar una posible asociación entre mediadores pro-inflamatorios, componente bacteriano y polimorfismos genéticos (*RANTES -403 G/A*, *CCR5 G59029A* y *TNF-308 G/A*) con parámetros periodontales en pacientes SD. **Materiales y métodos.** Muestras de saliva y fluido gingival crevicular (FGC) se obtuvieron de 30 personas con SD y 30 personas sin SD quienes asistieron a la clínica odontológica de periodoncia de la Universidad Autónoma de Yucatán. A todas se les realizó un examen odontológico completo y su diagnóstico periodontal. Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos *CCR5 G59029A*, *RANTES -403 G/A* y *TNF- $\alpha$  -308 G/A* se obtuvieron por conteo simple en todos los pacientes estudiados y se analizó la distribución de acuerdo a parámetros poblacionales para el equilibrio de Hardy-Weinberg. **Resultados.** Los resultados obtenidos se organizaron en pacientes con salud gingival, periodontitis etapa I-II y periodontitis etapa III -IV con SD y sin SD. Los niveles de IL-1 $\beta$  y IL-12 que se registraron en pacientes con SD fueron mayores tanto en salud, como en periodontitis estadio I-II y III-IV en comparación con los sujetos sin SD. La presencia del polimorfismo *CCR5 G59029A* en pacientes con SD se asoció a un alto riesgo a desarrollar periodontitis tanto para estadios tempranos (I -II), como para estadios más tardíos (III-IV). La cuantificación de polimorfismos reflejó una asociación entre el alelo de riesgo A del gen *CCR5 G59029A* y pacientes SD con periodontitis. **Conclusiones.** La detección de *CCR5 G59029A* advierte de un mayor riesgo de presentar periodontitis, el manejo en la terapia periodontal podría incluir otras alternativas con pacientes que presenten este polimorfismo.



## 1. Introducción

El síndrome de Down (SD) es una condición congénita multisistémica, descrita por primera vez por Langdon Down en 1866 (Alba Barraza & cols., 2020). Es la condición congénita más común a nivel mundial e incluye alteraciones del comportamiento y físicas (Pini & cols., 2016). Muchos de estos pacientes enfrentan diversos problemas de salud, tales como deterioro cognitivo, enfermedades cardíacas congénitas, enfermedad de Alzheimer (EA), cáncer y enfermedad de Hirschsprung, anomalías respiratorias, desbalances endocrinos e inmunológicos, sensibilidades alimentarias, apnea obstructiva del sueño, entre otros (Asim & cols., 2015). La causa más común de SD es la presencia de una copia adicional del cromosoma 21 que da lugar a una trisomía en este par en el genoma humano (Mubayrik & cols., 2016) siendo responsable del 90-95% de los casos. El 5% de los casos restantes pueden ser ocasionados por traslocación robertsoniana o isocromosoma o cromosoma en anillo (Asim & cols., 2015). Por muchos años esta condición fue identificada como un síndrome patológico, no obstante, el año 2020 la justicia chilena falló de manera histórica determinando que el SD no es una enfermedad y cualquier trato diferencial es causante de discriminación.

Existen varias características físicas que comparte la población con SD, entre ellas las anomalías craneofaciales y la hipotonía en la primera infancia (Asim & cols., 2015), estatura baja, ojos sesgados, orejas pequeñas y un solo pliegue profundo que cruza el centro de la palma de la mano (Fernandez, 2016), mientras que, a nivel oral, son múltiples las alteraciones que se describen en la literatura y cada individuo puede poseerlas en diferentes grados o no poseerlas, entre ellas: macroglosia, maloclusión, respiración bucal, morfología dentaria alterada y una pobre higiene oral (Demicheri & Batlle, 2011). La gran mayoría de los estudios publicados reportan una baja prevalencia de caries en este grupo de individuos en comparación a grupos que no presentan la condición de SD (Deps & cols., 2015). Por el contrario, la evidencia sustenta que la enfermedad periodontal y, en particular la periodontitis, incrementa su prevalencia en personas con SD (Frydman & Nowzari, 2012).

Una multitud de factores pueden estar involucrados en el aumento de la susceptibilidad a la periodontitis en individuos con SD. Los factores previamente

investigados incluyeron déficit cognitivo, composición de la placa subgingival, respuestas inmunes/inflamatorias, entre otras. Los estudios microbiológicos demostraron que las personas con SD tienen niveles significativamente más altos de bacterias periodonto-patógenas incluyendo *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*. Al mismo tiempo la quimiotáxis de neutrófilos en personas con SD estaba significativamente deteriorada y la pérdida de hueso alveolar era inversamente proporcional al índice quimiotáctico. Otros defectos inmunológicos asociados con la periodontitis en personas con SD incluyen disfunción de linfocitos y una producción alterada de anticuerpos. Mediadores inflamatorios (prostaglandina E2 y leucotrieno B4) y enzimas degradantes (matriz metaloproteinasa-9) también se ven incrementados en fluido gingival crevicular (FGC) de pacientes con SD (Khocht & cols., 2011).

Aunque la mala higiene oral es un factor importante en la patogenia de la enfermedad periodontal, estudios previos han indicado que la destrucción periodontal severa en individuos con SD no puede explicarse solamente por este factor (Cavalcante & cols., 2012). En efecto, es la respuesta inmune del individuo la que está comprometida con el desarrollo de la periodontitis en sujetos con SD. La alteración cuantitativa de la microbiota conduce a la activación de un proceso inflamatorio caracterizado por la liberación de mediadores pro-inflamatorios. Los agentes bacterianos actúan como antígenos desencadenando la respuesta inmunológica. Los leucocitos polimorfonucleares son las primeras células en reaccionar frente a la agresión bacteriana, dichas células son sustituidas por linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, mastocitos, eosinófilos y basófilos quienes participan en la respuesta inmune (Díaz, 2006). Levin investigó los componentes del sistema inmunológico en el SD. Sus estudios revelan un número anormal de células, un déficit en la quimiotáxis y una disminución en la fagocitosis (Levin, 1987). Izumi y cols realizaron un estudio en relación con el grado de alteración de la quimiotáxis de los neutrófilos y si existía relación con la enfermedad periodontal, concluyendo que la quimiotáxis influye en la progresión de la enfermedad periodontal en los sujetos con SD (Izumi & cols., 1989). En general, la respuesta del hospedero inducida por bacterias conduce a una cascada de

mediadores inflamatorios, que incluyen citoquinas, quimioquinas y prostaglandinas (Cavalcante & cols., 2012).

Así, resulta interesante determinar si la mayor prevalencia de periodontitis en la población afectada de SD se debe a la presencia de una mayor respuesta inflamatoria caracterizada particularmente por mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias, a la presencia de ciertos polimorfismos asociados a las mismas citoquinas pro-inflamatorias o a una mayor carga bacteriana de periodontopatógenos. De ser así, resulta relevante reforzar las medidas preventivas no sólo en los sujetos con SD, sino que en toda la población que presente estos polimorfismos.

## **2. Marco teórico**

### **2.1. Salud periodontal en pacientes con SD**

En 1960 Cohen y cols., fueron los primeros en reportar una mayor prevalencia de periodontitis en personas con SD. Posteriormente, muchas investigaciones demostraron que los niños y adolescentes con SD desarrollaban gingivitis y periodontitis más severas y generalizadas (Demichei & Batlle, 2011). La enfermedad periodontal en personas con SD se caracteriza por un inicio temprano generalizado en la dentición temporal y continúa en la dentición permanente, con la presencia de sacos periodontales en el 36% de niños a la edad de 6 años (Katuska & cols., 2015). Así, la prevalencia de la periodontitis incrementa en la población adulta afectada con SD en comparación con población sin SD (Scalioni & cols., 2018; Amano & cols., 2008). Johnson y colaboradores observaron una evolución rápida de la enfermedad, llegando a estadios semejantes a la gingivitis ulcero necrotizante o enfermedad periodontal necrotizante en forma muy precoz (Demichei & Batlle, 2011).

### **2.2. Patogenia de la periodontitis**

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica no transmisible producida por la disbiosis de la microbiota subgingival y se caracteriza por la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes: ligamento periodontal cemento radicular y hueso alveolar (Kinane & cols., 2017). La disbiosis de la microbiota se produce, al menos en parte, por cambios en la virulencia de bacterias residentes de la microbiota subgingival. Entre la bacterias que se asocian a la disbiosis se describen a *P. gingivalis* como un patógeno clave, el cual es capaz de inducir una respuesta inmune en el hospedero (Herrera & cols., 2018; Hajishengallis, 2014). Distintos estudios han demostrado la virulencia, inmunogenicidad y patogenicidad de *P. gingivalis*, evidenciando que existen serotipos asociados a salud o periodontitis (Díaz Zúñiga & cols., 2012; Díaz Zúñiga & cols., 2014; Díaz Zúñiga & cols., 2015; Vernal & cols., 2008; Vernal & cols., 2009; Vernal & cols., 2014). Las bacterias más inmunogénicas y virulentas son capaces de desencadenar una respuesta pro-inflamatoria y resorción ósea por estimulación de linfocitos T colaboradores Th1 y Th17 (del inglés *T helper*) que expresan el ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL), el cual participa directamente en los

procesos de estimulación de la diferenciación osteoclástica y en la activación de osteoclastos maduros (Vernal & cols., 2009; Vernal & cols., 2014; Díaz Zúñiga & cols., 2017; Díaz Zúñiga & cols., 2019; Melgar & cols., 2016; Monasterio & cols., 2018). Además, al evaluar el efecto de *P. gingivalis* en modelos murinos para inducir periodontitis experimental, se observó que los serotipos más virulentos inducen periodontitis experimental en comparación a los menos virulentos (Cafferata & cols., 2019; Díaz-Zúñiga & cols., 2020). Finalmente, y al evaluar la frecuencia de proliferación de linfocitos T de memoria en sujetos sanos o pacientes afectados de periodontitis, se determinó que los serotipos más virulentos de *P. gingivalis* se asocian directamente con la periodontitis, en comparación con los menos virulentos que se asociaron con la salud periodontal (Melgar & cols., 2016). La presencia de mediadores inflamatorios y de anticuerpos anti-patógenos orales se asocia también con otras condiciones o patologías, tales como alteraciones en el control metabólico en pacientes con Diabetes Mellitus, riesgo de parto prematuro con bajo peso al nacer y, recientemente, con enfermedad de Alzheimer (Marakoglu & cols., 2008; Ide & cols., 2016).

En los pacientes afectados con SD la mayor prevalencia de periodontitis se relaciona con factores locales y sistémicos propios de su condición (Amano & cols., 2008). Las causas locales pueden incluir una higiene oral reducida, cálculo, macroglosia, morfología de los dientes, o composición de la microbiota subgingival. En efecto, se describe que existe un mayor nivel de detección de *P. gingivalis*, *T. denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, y *A. actinomycetemcomitans* (Mubayrik, 2016). Aun así, no se puede demostrar que factores locales, como la presencia de una mayor cantidad de microbiota sea más importante que en otros pacientes en general, lo que probablemente esté relacionado a una respuesta desmedida en intensidad y extensión frente a un componente etiológico aparentemente menor (Demicheri & Batlle, 2011).

### **2.3. Mediadores pro-inflamatorios en SD**

Una vez generada la disbiosis, las bacterias clave tienen la capacidad de invadir al hospedero y alojarse en el tejido conectivo subyacente al epitelio de unión. Ahí, serán reconocidos por neutrófilos, macrófagos o células dendríticas, con el objetivo de fagocitarlos y procesarlos (Curtis & cols., 2020). Sin embargo, estas

bacterias tienen la capacidad de evadir la respuesta inmune e incrementar su número, lo que genera un aumento de su virulencia. Posteriormente, las células presentadoras de antígeno que reconocen a estas bacterias inducen una respuesta inmuno-inflamatoria. Una vez en el linfonodo, las células presentadoras de antígeno expresan a la molécula mayor de histocompatibilidad tipo II (del inglés major histocompatibility complex type II, MHC-II) en su superficie conjugada con el antígeno, moléculas co-estimuladoras y citoquinas, a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *naïve*, los que, reconocen a todo este complejo, se activan, proliferan y diferencian a los distintos fenotipos efectores de linfocitos T colaboradores (del inglés T helper, Th) (Cafferata & cols., 2018). Los linfocitos Th diferenciados migrarán hacia el sitio periodontal donde se produjo la invasión bacteriana para ejercer su rol inflamatorio (Th1), modulador (Th2), pro-resortivo (Th17) o inmuno-regulador (T regulador). Los linfocitos Th1 y Th17 secretarán una serie de moléculas inflamatorias capaces de activar a los pre-osteoclastos y osteoclastos. Así, esta respuesta inmune inducida ante ciertas bacterias es la responsable de la destrucción del hueso alveolar, característica principal de la periodontitis (Bartold & cols., 2013).

En los individuos afectados de SD, la inmuno-supresión antes mencionada, puede generar mayor susceptibilidad a enfermedades de origen infeccioso o disbiótico, incluyendo la periodontitis (Amano & cols., 2008). En el FCG de pacientes con SD se ha identificado mayor cantidad de marcadores pro-inflamatorios asociados a periodontitis, tales como prostaglandina E2 (PGE2), factor de necrosis tumoral (del inglés *tumor necrosis factor*, TNF)- $\alpha$ , interferón (IFN)- $\gamma$  y superóxido dismutasa (SOD)-1 (Tsilingaridis & cols., 2012).

#### **2.4. Citoquinas pro-inflamatorias en SD**

Los linfocitos Th cumplen un rol central en la respuesta del hospedero y mediante la influencia de citoquinas fenotipo-específicas pueden diferenciarse a los distintos subtipos Th1, Th2, Th17 y T reguladores (Treg) que median la inflamación, el daño tisular y autoinmunidad (Tsilingaridis & cols., 2012). Las citoquinas del perfil inflamatorio TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y la IL-6 son las primeras en ser secretadas por las células inmunes y promueven la secreción de metaloproteinasas de matriz (del inglés matrix metalloproteinases, MMPs) y el ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B (del inglés *ligand of the receptor activator of nuclear factor*  $\kappa$ B,

RANKL) para promover la migración celular y destrucción tisular. Así, la respuesta Th1 y Th17 inducida ante ciertas bacterias es la responsable de la destrucción de los tejidos durante la periodontitis (Cekici & cols., 2014).

#### **2.4.1. Citoquina IL-1**

El rol de la familia de citoquinas de IL-1 en la patogénesis de la periodontitis está bien documentada. El grupo de genes de IL-1 está compuesto por genes de IL-1A, IL-1B e IL-1RN que codifican para IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra), respectivamente. IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  participan en el inicio y progresión de la respuesta inmuno-inflamatoria. Las variaciones polimórficas en los genes de IL-1 son frecuentes y están asociadas con una respuesta inflamatoria exagerada al igual que los polimorfismos de un solo nucleótido en los siguientes *loci* del gen IL-1, como IL-1A<sup>+4845</sup>, IL-1B<sup>+3954</sup> e IL-1RN<sup>+2018</sup> que se relacionan con una mayor gravedad y susceptibilidad de muchas enfermedades inflamatorias, incluida la periodontitis (Khocht & cols., 2011). Como resultado del estudio de Khocht & cols., se determinó que la presencia de los alelos variantes de la familia de genes IL-1 en los sujetos con SD tendía a proteger contra la pérdida de inserción periodontal. La investigación mostró que los monocitos de individuos con polimorfismos protectores para *IL-1B* producen mayores cantidades de IL-1 $\beta$  que los monocitos de individuos con el genotipo *IL-1B* mutado (Khocht & cols., 2011). Al mismo tiempo Tsilingaridis & cols., investigaron las citoquinas relacionadas con los linfocitos Th, específicamente Th1, Th2 y Th17 en sujetos con SD y controles sanos con un grado similar de inflamación gingival, informando que la concentración de las siguientes citoquinas relacionadas con el fenotipo Th1, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en el FCG fueron significativamente mayores en sujetos con SD en comparación con los controles (Tsilingaridis & cols., 2012).

#### **2.4.2. Citoquina IL-6**

La IL-6 parece inducir la resorción ósea, tanto de forma aislada como sinérgicamente con IL-1 $\beta$ , debido a una estimulación y diferenciación sobre los precursores de los osteoclastos. IL-6 se ha encontrado en concentraciones elevadas en el tejido gingival inflamado, en el FGC y en sangre periférica en pacientes con diagnóstico de periodontitis (Ruiz García & cols., aceptado 2021). Se

han descrito distintos polimorfismos de la región promotora del gen de IL-6, como el g.-572G>C, g.-373A(n)T(n), -597G>A, p.D358A y g.-174G>C, siendo estos dos últimos los más estudiados (Kornman & Di Giovine, 1998; Dongari-Bagtzoglou & Ebersole, 1998). Para el polimorfismo g.-174G>C, el genotipo GC ha presentado la prevalencia más elevada en la mayoría de los estudios poblacionales realizados (Ruiz García & cols., aceptado 2021). Mientras Raunio & cols., demostraron una asociación entre el polimorfismo g.-174G>C y la presencia de IL-6 en 52 pacientes de origen finés con periodontitis severa (Raunio & cols., 2007), Shao & cols. realizaron una revisión sistemática y meta-análisis basados en la asociación entre el polimorfismo g.-174 G>C y periodontitis, reportando que el genotipo GG aumentaba el riesgo de periodontitis agresiva, pero no modificaba el riesgo para periodontitis crónica (Raunio & cols., 2007; Shao & cols.,2009)

#### **2.4.3. Ligando 5 de quimioquina CCL5 y Receptor de quimioquina C-C (CCR)5**

Las quimioquinas constituyen una gran familia de péptidos que se caracterizan por un grado relativamente alto de similitud en sus secuencias de aminoácidos, pequeños pesos moleculares y presencia de cisteínas en posiciones conservadas que dan como resultado una estructura tridimensional característica. En 1992, considerando el alto número de estos ligandos que podían atraer leucocitos, se les llamó oficialmente quimioquinas, una combinación de las palabras "quimiotáctica" y "citoquina", es decir, citoquinas que promueven la quimiotaxis. En la nomenclatura sistemática cada quimioquina se designa por su clase seguida de la letra L (para ligando) y un número basado en el orden cronológico en el que fue identificado. Los receptores de quimioquinas son denotados de manera similar por la clase a la que se une, la letra R (receptor) y un número (Soler. G, 2021).

El ligando 5 de quimioquina (motivo CC) (CCL5), también conocido como RANTES (regulado por activación de células T normales expresadas y secretadas), es una quimioquina de la subfamilia CC específica para tipos celulares que expresan receptores transmembrana de tipo CCR1, CCR3 y CCR5 presentes en linfocitos Th1, monocitos/macrófagos, células dendríticas, basófilos y eosinófilos, induciendo su activación, polarización, proliferación y quimiotaxis (Sansores & cols., 2017).



CCL5 se ha encontrado específicamente en tejidos periodontales de sujetos periodontalmente comprometidos, comparados con controles, y su concentración disminuye en el FCG después de aplicada la terapéutica periodontal. Al mismo tiempo, CCR5, el principal receptor de CCL5, también ha sido relacionado con la enfermedad periodontal. Se ha demostrado que CCR5, expresado en las células Th1, induce la pérdida de hueso alveolar en un modelo experimental de ratones para el estudio de periodontitis (Shih & cols., 2014). Mientras los linfocitos Th1 son considerados la mayor fuente de RANKL —molécula inductora de la activación de los osteoclastos en las patologías periodontales—, las células dendríticas y los macrófagos son potenciales precursores de osteoclastos, reforzando el rol de RANKL en la pérdida ósea (Sansores & cols., 2017).

En estudios *in vitro* se han observado diferentes respuestas dependiendo de la concentración utilizada de CCL5, donde concentraciones menores a 100 nM se observa sólo una actividad quimiotáctica, y a concentraciones mayores de 100 nM, la activación de células T, sugiriendo que ambos tipos de respuesta, dependientes de la concentración, pueden tener un rol importante en el inicio o progresión de la periodontitis (Levy, J. 2009).

#### **2.4.4. Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

Entre los mediadores pro-inflamatorios, el TNF- $\alpha$  se ha vinculado con la resorción ósea (Ataoglu.T., 2002). TNF- $\alpha$  es un mediador soluble liberado a partir de células inmuno-competentes, fundamentalmente monocitos/macrófagos. TNF- $\alpha$  tiene un amplio rango de efectos pro-inflamatorios e inmuno-moduladores en diferentes poblaciones celulares, tales como estimular la síntesis de prostaglandinas, la producción de proteasas y activar la función osteoclástica y, por tanto, la resorción ósea. Las variadas funciones de TNF- $\alpha$  sugieren que desempeña un rol importante en la modulación de las respuestas inmuno-inflamatorias iniciadas por infección o injuria (Flores & cols., 2011) y su incremento ha sido detectado en pacientes con periodontitis. Para prevenir una respuesta inflamatoria excesiva que conlleve a la destrucción tisular, la actividad de TNF- $\alpha$  debe ser regulada, de manera fisiológica, por las citoquinas inmuno-moduladoras IL-10, IL-4 y las formas solubles de sus receptores (Carrillo de Albornoz & cols., 2006).

En la enfermedad periodontal, TNF- $\alpha$  induce el reclutamiento de leucocitos circulantes y estimula la producción de otros mediadores, como PGE, IL-1, IL-6, MMP y factor activador de plaquetas, amplificando o manteniendo la respuesta inflamatoria. De esta manera, la capacidad reparativa del periodonto se reduce, dando como resultado un balance negativo con destrucción tisular (Graves & cols., 2003). Se han descrito varios polimorfismos dentro del gen TNF: el alelo en la posición -308 (denotado como TNF2) ha sido el más estudiado y está asociado a una alta transcripción del gen de TNF- $\alpha$  (Casas & Gomez. 2008).

En el estudio de Rostami & cols., se midieron los niveles de TNF- $\alpha$  en suero extraído de sangre de niños con SD, niños con incapacidad intelectual y niños sanos, llegando a la conclusión que los niveles de TNF- $\alpha$  fueron significativamente mayores en el grupo de niños con SD en comparación al grupo de niños sanos. Al mismo tiempo se encontraron niveles significativamente más bajos de IL-10 en niños con SD en comparación al grupo con incapacidad intelectual. Dado que se sabe que la IL-10 tiene un efecto inmuno-modulador que inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias (como IL-6 y TNF- $\alpha$ ), los cambios recíprocos en el nivel sérico de IL-10 y TNF- $\alpha$  son comprensibles en niños con SD (Rostami & cols.,2012)

## **2.5. Planteamiento del Problema**

Estudios previos han sugerido que los factores genéticos pueden desempeñar un rol en el desarrollo de la enfermedad periodontal (Shih & cols., 2014). Estudiar los genes asociados con el SD continúa siendo un tema central, ofreciendo grandes retos para el futuro. El análisis de la patogenia, así como del desarrollo de la enfermedad periodontal en personas con SD permite identificar factores que agravan los cuadros clínicos y complican la prevención y el tratamiento de la patología. Se ha demostrado en estudios anteriormente mencionados la participación de mediadores inflamatorios específicos (IL-6, CCR5, CCL5, TNF- $\alpha$ ) en la progresión de la enfermedad periodontal, en individuos con o sin SD, dando como resultado una clara participación en la destrucción tisular y posterior pérdida ósea que caracteriza a esta enfermedad (Ruiz García & cols., aceptado 2021; Raunio & cols., 2007; Shih & cols., 2014; Levy, J. 2009; Rostami & cols.,2012). Actualmente no existen estudios que evalúen la prevalencia de polimorfismos de

mediadores pro-inflamatorios relacionados con la enfermedad periodontal en personas con SD.

En cuanto a la carga bacteriana que poseen los pacientes con SD, se observó una composición microbiana alterada de la microbiota subgingival, detectándose una mayor frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga* y *P. gingivalis* (Martinez & cols., 2013). Además, anticuerpos anti-*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *Selenomonas sputigena*, *A. actinomycetemcomitans* y *Streptococcus mitis* se correlacionaron positivamente con los signos clínicos de enfermedad periodontal en la dentición temporal de niños con SD (Morinushi & cols., 1997). Otros estudios han sugerido que los niños con SD experimentan una colonización muy temprana de varios periodonto patógenos, con una mayor prevalencia de especies como *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola* (Amano & cols., 2000). En estudios más recientes de carga bacteriana de pacientes con SD, como el de Carrada & cols., 2016, se observaron asociaciones positivas entre los niveles de patógenos periodontales en la saliva y en la microbiota subgingival, observándose correlaciones entre *A. actinomycetemcomitans* (78,95 %), *P. gingivalis* (86,84 %), *T. denticola* (94,74 %), *T. forsythia* (96,05 %), *C. rectus* (85,53 %), *P. intermedia* (85,53 %), *F. nucleatum* (98,68%) y *P. nigrescens* (67,11%) en las muestras de microbiota salival y subgingival de pacientes con periodontitis crónica y periodontitis agresiva. La evaluación microbiológica demostró una alta prevalencia (80-100%) de las ocho especies de periodonto patógenos en la muestra total. En muestras de participantes en el grupo SD, la prevalencia varió del 96,7% (*C. rectus*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum* y *P. intermedia*) al 100% (*A. actinomycetemcomitans*, *P. nigrescens* y *T. forsythia*). Estas tasas fueron más altas que las reportadas en estudios previos, sin embargo, considerando el número de células bacterianas de cada especie, los niños y adolescentes con SD presentaron un mayor porcentaje de microorganismos presentes en la saliva en comparación con los participantes del grupo sin SD. Los resultados del mismo estudio indican que los niños y adolescentes con SD tienen una mayor susceptibilidad a los cambios periodontales y una mayor prevalencia y densidad de algunos patógenos periodontales. Estos resultados son consistentes con la idea de que en estos sujetos, ciertas bacterias periodonto patógenas y asociaciones específicas entre

ciertas especies pueden contribuir al aumento de la prevalencia y gravedad de la enfermedad periodontal en el futuro (Carrada & cols., 2016).

En términos generales, resulta interesante determinar si la mayor prevalencia de periodontitis en la población afectada de SD se debe a la presencia de una mayor respuesta inflamatoria caracterizada por mayores niveles de citoquinas a nivel local, a la presencia de algún polimorfismo asociado a CCR5, RANTES y/o TNF- $\alpha$  o a una mayor carga bacteriana.

### 3. Hipótesis

En pacientes con SD, las variantes polimórficas de los genes *RANTES -403 G/A* , *CCR5 G59029A* y *TNF-308 G/A* se asocian con mayor carga bacteriana, mayor concentración de mediadores pro-inflamatorios y enfermedad periodontal más severa, en comparación a sujetos sin SD.

### 4. Objetivo general

Determinar si existe asociación entre variantes polimórficas de los genes *RANTES -403 G/A*, *CCR5 G59029A* y *TNF-308 G/A* con la carga bacteriana, concentración de mediadores pro-inflamatorios y severidad de enfermedad periodontal en saliva y fluido gingival crevicular de pacientes con y sin SD.

### 5. Objetivos específicos

1. Determinar el estado periodontal de personas afectadas de Síndrome de Down.
2. Cuantificar los niveles de mediadores IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17A e IL-21 en muestras de fluido crevicular gingival, en pacientes con y sin Síndrome de Down.
3. Determinar la presencia de los polimorfismos *RANTES -403 G/A* , *CCR5 G59029A* y *TNF-308 G/A* en muestras de saliva en pacientes con y sin Síndrome de Down.
4. Asociar el diagnóstico periodontal, con la presencia de mediadores pro-inflamatorios cuantificados y los polimorfismos identificados en personas con o sin Síndrome de Down.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1. Tipo de estudio**

Observacional, descriptivo, analítico y transversal.

### **6.2. Población de estudio, muestreo y criterios de elegibilidad**

Se incluyeron 30 pacientes entre 8 y 40 años de edad con SD, que acudieron a la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) en el periodo de Mayo 2019 - Noviembre 2020. La estrategia de muestreo para reclutar a los pacientes cumplió con los siguientes criterios de inclusión: sujetos hombres o mujeres, de 8 a 40 años de edad con SD que contaran con un consentimiento informado para participar en el estudio por parte de su representante legal en los casos necesarios (Anexo N°1). Además, que no hayan consumido analgésicos esteroidales, no esteroidales o antibióticos al menos 6 meses antes, no haber sufrido accidentes vasculares encefálicos, no haber recibido tratamiento periodontal previo a 6 meses, fumadores o alcohólicos o que por su estado cognitivo estén inhabilitados para colaborar con el estudio. Pacientes que durante el desarrollo del trabajo sufrieron de alguna enfermedad infecciosa distinta a la periodontitis, debieron tener tratamiento con analgésicos o antibióticos o sufrieron de accidente vascular, infarto agudo al miocardio o quedaron embarazadas se excluyeron. Como controles se seleccionaron 30 sujetos sin SD, entre 15 y 30 años, quienes asistían a la clínica odontológica de periodoncia de la Universidad Autónoma de Yucatán (Arriola, 2020).

Todos los pacientes (incluidos y excluidos) fueron examinados por dos operadores y responsables de la ejecución del proyecto en la UADY (Prof. Dr. Martínez y Dra. Pinzón). Las personas incluidas en el estudio fueron agendados para la evaluación periodontal, toma de muestras y terapia periodontal con el investigador asociado (Prof. Arriola).

### **6.3. Examen periodontal**

A cada paciente se le realizó un examen periodontal por un único operador (Prof. Arriola) y en el periodontograma se registró la profundidad al sondaje, la posición de la encía marginal, el nivel de inserción clínico, el índice de sangrado y

el índice de placa en 6 sitios periodontales por diente, excluyendo los terceros molares. El periodontograma utilizado fue el “Periodontal Chart”, un programa diseñado por la Universidad de Berna y de acceso gratuito <https://www.periodontalchart-online.com/uk/>. Para el diagnóstico periodontal se consideraron los parámetros de la clasificación de enfermedades periodontales de 2017 de la AAP y EFP. El diagnóstico de “salud periodontal” se determinó utilizando los criterios presentados de *salud periodontal clínica* definido como: Un estado caracterizado por una ausencia o niveles mínimos de inflamación clínica en un periodonto con estructuras de soporte normales. El diagnóstico de gingivitis se establecerá cuando se detecte un sangrado al sondaje entre  $\geq 10\%$  (localizada) y  $\geq 30\%$  (generalizada); en pacientes con un periodonto reducido se considerará una pérdida de inserción y sangrado al sondaje con  $\geq 10\%$ , y sin sangrado al sondaje y sitio con  $\geq 4$  mm de profundidad. La periodontitis se diagnosticó según los criterios del estadiaje presentado. El estadio I se diagnosticó al observarse la presencia de pérdida de inserción clínica de 1 a 2 mm, una puntuación de sondaje máxima de  $\leq 4$  mm y sin pérdida de dientes debido a periodontitis. El estadio II se diagnosticó al observarse la presencia de pérdida de inserción clínica de 3 a 4 mm, una puntuación de sondaje máxima de  $\leq 5$  mm y sin pérdida de dientes debido a periodontitis. El estadio III se diagnosticó al observarse la presencia de pérdida de inserción clínica de  $\geq 5$  mm, las complicaciones del estadio II y adicionalmente una profundidad al sondaje de  $\geq 6$  mm con pérdida de dientes debido a periodontitis en al menos 4 dientes. El estadio IV se diagnosticó al observarse la presencia de pérdida de inserción clínica de  $\geq 5$  mm, las complicaciones del estadio III y la pérdida de dientes debido a periodontitis de más de 5 dientes (Arriola, 2020).

#### **6.4. Obtención de muestras de fluido crevicular gingival y saliva**

A los pacientes se le tomaron muestras de FCG y saliva por un único operador especialista en odontopediatría (Prof. Arriola) y tal como se detalla a continuación:

1. A todos los pacientes se les instruyó para obtener una muestra de saliva estimulada. Para ello, a cada paciente se le entregó una tableta de parafina libre, la que masticó durante 60 segundos sin deglutir, depositando la saliva acumulada y la pastilla de parafina en un tubo de 50 mL libre de RNAsas.

2. Las muestras se mantuvieron a 4°C y se trasladaron hasta el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Regionales “Dr Hideyo Noguchi” de la UADY donde fueron liofilizadas.
3. Luego, las muestras liofilizadas y rotuladas se enviaron al Laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile por Fedex, donde fueron reconstituidas, cuantificadas y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento (Arriola, 2020).
4. Posteriormente, a cada paciente se le tomaron muestras de FCG. Brevemente, las muestras de FCG se tomaron según el protocolo reportado por Vernal & cols., 2005. El diente con el mayor valor de profundidad de sondaje detectado en los sacos periodontales del examen periodontal se aisló de manera relativa, se eliminó el microbiota supragingival con una cureta Gracey 11/12 o 13 /14 estéril y se introdujo un PerioPaper® (OralFlow Inc.) en el surco gingivodentario o saco periodontal durante 1 min.
5. Luego, se introdujo en un tubo estéril rotulado con los datos del paciente y se almacenó a 4°C hasta su traslado al ultra congelador del laboratorio de microbiología oral de la Facultad de Odontología UADY, para almacenarse a -80°C. Las muestras contaminadas con sangre o saliva se descartaron.
6. Las muestras se liofilizaron y enviaron al Laboratorio de Biología Periodontal, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile por Fedex. Una vez en este laboratorio, las muestras se reconstituyeron mediante la adición 100µL de tampón de fosfato salino (PBS) estéril y centrifugaron a 10.000 x g durante 15 min a 4°C. La muestra eludida se almacenó nuevamente a -80°C hasta su análisis (Arriola, 2020).

### **6.5. Cuantificación de proteínas**

A partir de 100 µL de eluido de FGC se cuantificaron los niveles de secreción de las moléculas IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17A e IL-21 mediante inmunoensayo Multiplex, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific®) disponibles en línea



([https://www.thermofisher.com/documentconnect/documentconnect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFSAssets%2FLSG%2Fmanuals%2FLHC0009M\\_Lot\\_1402357.pdf&title=SHVtYW4gQ3l0b2tpbmUgTWFnbmV0aWMgMjUtUGxleCBQYW5lbA==](https://www.thermofisher.com/documentconnect/documentconnect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFSAssets%2FLSG%2Fmanuals%2FLHC0009M_Lot_1402357.pdf&title=SHVtYW4gQ3l0b2tpbmUgTWFnbmV0aWMgMjUtUGxleCBQYW5lbA==)) y se evaluó la absorbancia usando un lector automatizado de placas del sistema Luminex™ (Bio-Tek, Winooski, VT, USA). Este procedimiento se realizó en el laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

### **6.6. Detección de polimorfismos**

Para la determinación del polimorfismo *RANTES -403 G/A*, *CCR5 G59029A* y *TNF-308 G/A* se realizó una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando sondas tipo TaqMan® (Thermo Fisher Scientific) y los primers específicos (Tabla N°1). El DNA genómico se obtuvo de las muestras de saliva de todos los pacientes, a partir de leucocitos en saliva total utilizando el kit DNeasy blood and tissue (Qiagen). Este procedimiento se realizó en el laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. A partir de 1µL de DNA se amplificaron los genes blancos mediante qPCR utilizando el kit Type-it Fast SNP probe PCR Master Mix 2x (Qiagen) y según los siguientes condiciones de amplificación: 95°C por 2 min seguido de 40 ciclos cada uno de 95°C por 15 s y 60°C por 30 segundos (Arriola, 2020).

Se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos *CCR5 G59029A*, *RANTES -403 G/A* y *TNF-α -308 G/A* por conteo simple en todos los pacientes estudiados, tanto para casos como para controles y se analizó la distribución de acuerdo a parámetros poblacionales para el equilibrio de Hardy-Weinberg.

**Tabla 1.** Secuencias de las sondas TaqMan de los polimorfismos.

Polimorfismo	Rs	Reporteros	Secuencia
<b>RANTES -403 G/A</b>	2107538	VIC/FAM	TCCTGCTTATTCATTACAGATCTTA[C/T]CTCCTTTC CCTCATCCATGGAAGGA
<b>TNF -308 G/A</b>	1800629	VIC/FAM	GAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATG[A/G]GGACG GGGTTTCAGCCTCCAGGGTCC
<b>CCR5 G59029A</b>	1799987	VIC/FAM	TACGGGGAGAGTGGAGAAAAAGGGG[A/G]CACAG GGTTAATGTGAAGTCCAGGA

*Rs: Número de identificación de polimorfismos.*

*Reporteros: Fluoróforos*

### **6.7. Equilibrio de Hardy-Weinberg**

Para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W), se utilizó una prueba de  $\chi^2$  comparando los genotipos de cada uno de los polimorfismos en cada población control estudiada, utilizando el paquete estadístico GenAlex para la plataforma Excel (Microsoft Office). La distribución de las frecuencias genotípicas en los polimorfismos estudiados RANTES-403 G/A, CCR5 G59029A y TNF-308 G/A se ajustaron a las expectativas de H-W de equilibrio de la población control.

### **6.8. Análisis de los datos**

Los datos clínicos obtenidos de cada paciente (índice de placa, de sangrado y nivel de inserción clínico) se representan como valores promedio  $\pm$  desviación estándar. Los datos de la cuantificación de los mediadores pro-inflamatorios se representan en gráficas que expresan el valor promedio en ng/mL  $\pm$  desviación estándar. La asociación entre los diferentes grupos de alelos y genotipos de los polimorfismos de RANTES-403 G/A, CCR5 G59029A y TNF-308 G/A en pacientes afectados o no de SD se estimaron usando el riesgo en términos de razón de momios, tomando con valor de referencia la frecuencia del genotipo y del alelo

silvestre con un intervalo de confianza (IC) del 95%. Los niveles de significancia se determinaron utilizando tablas de contingencia de  $\chi^2$ . Se realizó de igual forma una regresión logística multinomial para ajustar las covariables, sexo, edad y los genotipos de los genes CCL5 (RANTES), TNF- $\alpha$  y CCR5 se consideraron como variables independientes en la regresión logística. Todos estos datos se analizaron mediante el test Shapiro-Wilk para determinar la homogeneidad de los datos y, según ello, se procedió a realizar la prueba de ANOVA-Tukey o Kruskal-Wallis-Dunn y utilizando el software SPSS v5.0.

## 7. Resultados

Entre los meses de septiembre a noviembre del año 2019 se evaluó un total de 30 pacientes con SD y 30 sin SD. En base a la evaluación periodontal se determinó la presencia o ausencia de periodontitis, donde finalmente los participantes quedaron reunidos en los siguientes grupos: pacientes con salud periodontal, con periodontitis estadio I-II y con periodontitis en estadio III-IV, con o sin SD, completando en total 6 grupos. La edad promedio, el porcentaje de mujeres y los parámetros periodontales se representan en la Tabla N°2.

### 7.1. Evaluación del estado periodontal

Al evaluar los parámetros periodontales se pudo observar que los pacientes con periodontitis estadio III-IV y SD presentaron un mayor IS e IP en comparación con los pacientes sin SD o sujetos sanos (Tabla N°2).

**Tabla 2.** Parámetros clínicos.

SD: síndrome de Down, NIC: nivel de inserción clínica, IS: índice de sangrado, IP: índice de placa.

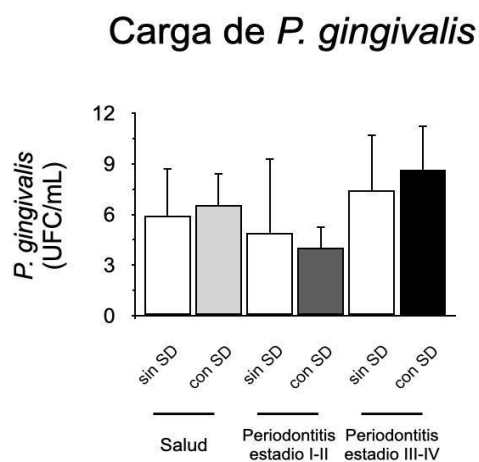
	Salud		Periodontitis estadio I-II		Periodontitis estadio III-IV	
	sin SD (n=10)	con SD (n=3)	sin SD (n=12)	con SD (n=19)	sin SD (n=8)	con SD (n=8)
Edad	15,80 ± 1,03	12,33 ± 4,93	21,20 ± 3,83	17,66 ± 5,81	31,00 ± 4,8	24,5 ± 6,13
Género (Femenino)	50% (5)	66,6 % (2)	50% (6)	36% (7)	63% (5)	50 % (4)
NIC (mm)	-0,67 ± 0,89	-1,77 ± 0,47	-2,35 ± 1,65	-2,74 ± 0,49	-6,8 ± 1,97	-3,45 ± 0,44
IS (%)	5,30 ± 2,90	2,67 ± 1,53	28,80 ± 5,78	22,00 ± 10,06	41,90 ± 10,23	71,00 ± 22,17
IP (%)	12,70 ± 2,49	10 ± 1,0	31,70 ± 7,27	21,94 ± 10,84	45,50 ± 7,09	49,50 ± 19,97
<i>P. gingivalis</i> load (CFU/mL)	5,78 ± 0,74	4,91 ± 1,99	9,01 ± 2,10	4,53 ± 2,05	9,31 ± 2,77	8,66 ± 2,68

Al evaluar la distribución del diagnóstico periodontal según la presencia o ausencia de SD se observó que mientras los pacientes sin SD presentaron periodontitis en estadio I (23%), estadio II (17%), estadio III (17%) y estadio IV (10%), los pacientes con SD presentaron periodontitis en estadio I (33%), estadio II (26%), estadio III (15%) y estadio IV (15%) (Tabla N°3).

**Tabla 3.** Diagnóstico periodontal.

	Condición	
	sin SD (n=30)	con SD (n=27)
Salud periodontal	33 %	11 %
Periodontitis estadio I	23 %	33 %
Periodontitis estadio II	17 %	26 %
Periodontitis estadio III	17 %	15 %
Periodontitis estadio IV	10 %	15 %

SD: Síndrome de Down

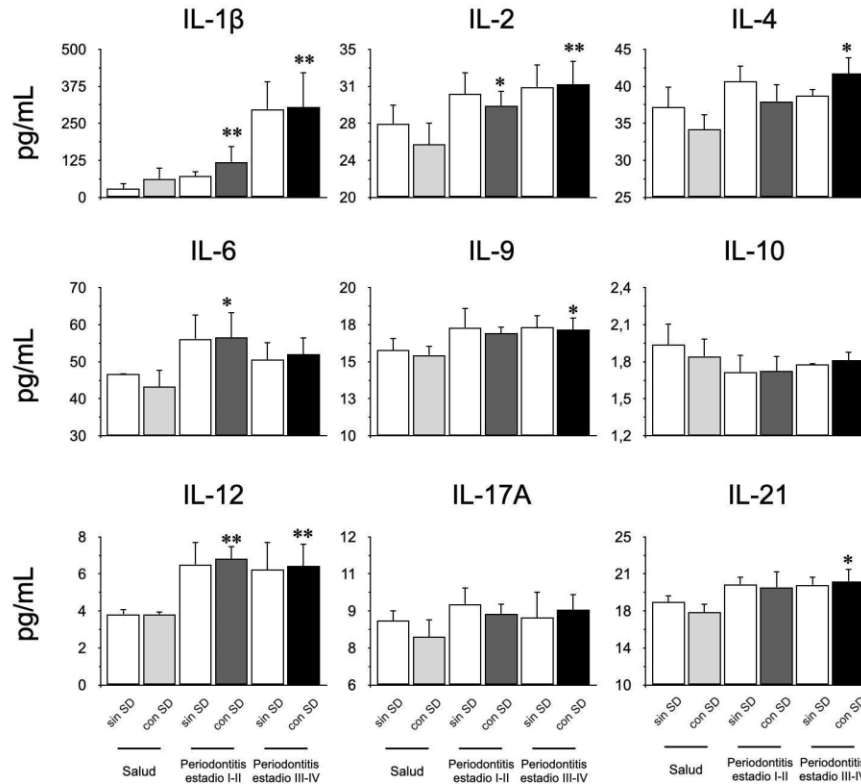


Como un dato interesante, se pudo detectar la presencia de *P. gingivalis* en los sacos o sitios de mayor profundidad, como se observa en la Fig. N°1. En muestras de microbiota subgingival de todos los pacientes se cuantificó mediante qPCR la presencia de *P. gingivalis* mediante el cálculo de las UFC/mL (Fig. N°1). Curiosamente, en todos los grupos descritos previamente no se detectaron diferencias en la carga de *P. gingivalis*.

**Figura N°1. Detección de *P. gingivalis* en muestras de microbiota.** A partir de muestras de microbiota de sujetos sanos y pacientes con periodontitis afectados o no de SD, se detectó la presencia de *P. gingivalis* mediante la cuantificación de la subunidad ribosomal 16S.

## **7.2. Cuantificación de los mediadores en FCG**

A partir de las muestras de FCG de todos los pacientes, los niveles de secreción de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17A, e IL-21 se cuantificaron mediante Multiplex (Fig. N<sup>o</sup>2). Para las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 e IL-12 se detectó un incremento en las personas con SD y periodontitis etapa I-II en comparación a aquellas con SD y salud periodontal. Para las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-12, e IL-21 se detectó un aumento en los pacientes con SD y periodontitis estadio III-IV, en comparación con sujetos con SD y salud periodontal. Curiosamente, no se encontraron diferencias para la citoquina pro-resortiva IL-17A. Al analizar las citoquinas inmuno-moduladoras o reguladoras, se detectó un aumento significativo de IL-4 en sujetos con SD y periodontitis estadio III-IV en comparación con sujetos con SD y salud periodontal. Además, para IL-10 se detectó una disminución en los niveles de secreción en pacientes con periodontitis y SD, en comparación con los sujetos con SD y salud periodontal, pero sin ser significativos. Finalmente, al comparar los niveles de las distintas citoquinas cuantificadas en los FGC de las personas con SD con las obtenidas de sujetos sin SD, no se detectaron diferencias. En efecto, los niveles de secreción en ambas condiciones de sujetos con salud gingival, con periodontitis estadio I-II o III-IV fueron similares y no se detectaron diferencias entre ellos. De esta manera, pudimos detectar que las personas afectadas de SD y periodontitis no presentaron mayores niveles de inflamación que personas sin SD y periodontitis.



**Figura N°2. Cuantificación de mediadores pro-inflamatorios, osteo-resortivos, inmunomoduladores o immuno-reguladores en FCG de pacientes con o sin SD.** A partir de muestras de FCG de sujetos sanos y pacientes con periodontitis afectados o no de SD, se cuantificaron los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17A, e IL-21 mediante Multiplex. Análisis a partir de 60 pacientes en total. Análisis de ANOVA-Tukey, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### 7.3. Identificación de los polimorfismos

A partir del DNA genómico que se obtuvo de las muestras de saliva de todos los pacientes, se detectó la presencia de polimorfismos específicos de RANTES-403 G/A, CCR5 G59029A y TNF-308 G/A en pacientes SD con salud periodontal, periodontitis etapa I-II; III-IV, y personas sin la condición SD tanto sanas como con periodontitis. Para la genotipificación de cada uno de los polimorfismos se utilizó el ABI One Step Plus qPCR (Applied Biosystems) y se obtuvieron los siguientes parámetros para la identificación de cada uno de los polimorfismos a estudiar (Figura 3 A, B, C).

Figura 3A

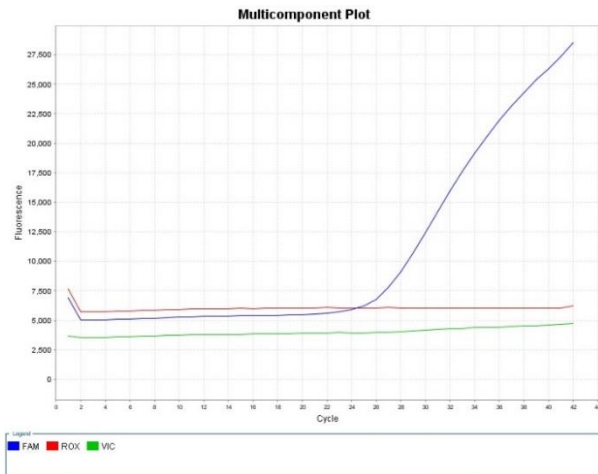
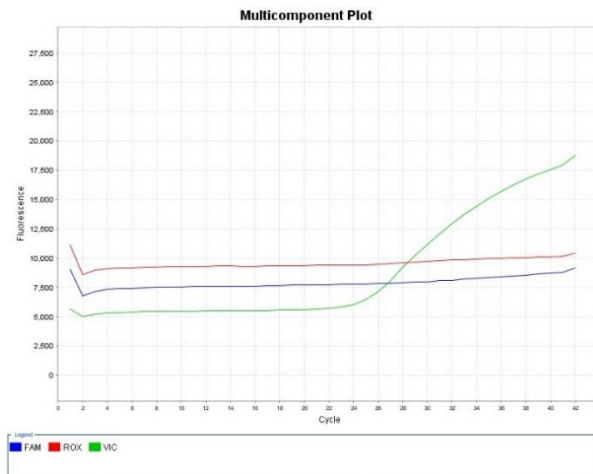


Figura 3B



Figura 3C



**Figura 3. Resultado del qPCR utilizando los fluoróforos VIC y FAM para la identificación de los polimorfismos a estudiar.** A partir de 30 muestras de saliva de pacientes con SD se cuantificaron los polimorfismos de los genes mediante qPCR. A) se observa una elevada fluorescencia del marcador FAM, lo que nos indica la presencia del genotipo Silvestre (WT). B) se observa fluorescencia de ambos marcadores lo que indica la presencia del genotipo heterocigoto mutado (HT). C) se observa la fluorescencia del marcador VIC indicando la presencia del genotipo homocigoto mutado (MT). En todas las figuras se observa el fluoróforo ROX que sirve como marcador pasivo de la reacción.

La asociación entre los diferentes grupos de alelos y genotipos de los polimorfismos RANTES-403 G/A, CCR5 G59029A y TNF-308 G/A en pacientes con SD con salud, periodontitis en sus distintas etapas y pacientes sin SD con y sin periodontitis fueron estimados usando el riesgo en términos de razón de momios, tomando con valor de referencia la frecuencia del genotipo y del alelo silvestre con un intervalo de confianza (IC) del 95%. A partir de esto se construyeron tablas para



el análisis de la frecuencia genotípica de cada polimorfismo y su factor de riesgo asociado a la periodontitis (Tablas 4,5,6,7,8,9,10,11 y 12)

**Tabla 4.** Análisis de frecuencias genotípicas y alélicas de RANTES-403/G/A de pacientes SD con salud gingival y su factor de riesgo asociado a salud gingival.

RANTES-403 G/A					
	Frecuencias Genotípicas			Frecuencias Alélicas	
	GG	GA	AA	G	A
<b>Casos</b>	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	3 (50%)	3 (50%)
<b>Controles</b>	4 (40%)	4 (40%)	2 (20%)	12 (60%)	8 (40%)
OR		7.0000	1.8000		1.5000
95% CI		0.2745 - 17 8.4763	0.0266 - 121. 7123		0.2398 - 9.3828

GG: genotipo silvestre; GA: genotipo heterocigoto; AA: homocigoto mutado; OR: *odds ratio* \*p<0.05, \*\*p<0.01. *Controles: Pacientes sin SD en salud gingival.*

En cuanto al polimorfismo -403 G/A del gen RANTES se observó una frecuencia del 100% (n=3) del HT (GA) en los casos, en los controles se observó una frecuencia del 40% (n=4) del WT (GG) , un 40% (n=4) del HT (GA), y un 20% del MT (AA). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y alelos de los casos y los controles para este polimorfismo.

**Tabla 5.** Frecuencias genotípicas y alélicas de CCR5 G59029A de pacientes SD en Salud Gingival

CCR5 G59029A					
	Frecuencias Genotípicas			Frecuencias Alélicas	
	GG	GA	AA	G	A
<b>Casos</b>	1 (33.3%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	3 (50%)	3 (50%)
<b>Controles</b>	2 (20%)	2 (20%)	6 (60%)	5 (25%)	15 (75%)
OR		1.0000	0.3333		0.3333
95% CI		0.0335 - 29.8093	0.0136 - 8.1830		0.0502 - 2.2143

GG: genotipo silvestre; GA: genotipo heterocigoto; AA: homocigoto mutado; OR: *odds ratio* \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . *Controles: Pacientes sin SD en salud gingival.*

En el polimorfismo G59029A del gen CCR5 se observó una frecuencia del 33.3% (n=1) del WT (GG), y la misma frecuencia del 33,3% tanto para el HT(GA) como para el MT (AA) en los casos, en los controles se observó una frecuencia del 20% (n=2) del WT (GG) , un 20% (n=2) del HT (GA), y un 60% del MT (AA). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y alelos de los casos y los controles para este polimorfismo.

	TNF-308 G/A				
	Frecuencias Genotípicas			Frecuencias Alélicas	
	GG	GA	AA	G	A
<b>Casos</b>	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)
<b>Controles</b>	9 (90%)	1 (10%)	0 (0%)	19 (95%)	1 (5%)
OR		0.9048	2.7143	1.0000	
95% CI		0.0294 - 27.8601	0.0447 - 16 4.9499	0.0361 - 27.70 16	

**Tabla 6.** Frecuencias genotípicas y alélicas de TNF-308 G/A de pacientes SD en Salud Periodontal.

GG: *genotipo silvestre*; GA: *genotipo heterocigoto*; AA: *homocigoto mutado*; OR: *odds ratio* \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Controles: *Pacientes sin SD en salud gingival*.

En el polimorfismo -308 G/A del gen TNF se observó una frecuencia del 100% (n=3) del WT (GG) mientras que en los controles se observó una frecuencia del 90% (n=9) del WT (GG) , un 10% (n=1) del HT (GA) y no se registró frecuencia del MT (AA). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y alelos de los casos y los controles para este polimorfismo.

**Tabla 7.** Frecuencias genotípicas y alélicas de RANTES -403 G/A de pacientes SD con periodontitis etapa I-II.

	RANTES-403 G/A				
	Frecuencias Genotípicas			Frecuencias Alélicas	
	GG	GA	AA	G	A
<b>Casos</b>	3 (19%)	6 (37%)	7 (44%)	9 (35%)	17 (65%)
<b>Controles</b>	3 (60%)	0 (%)	2 (40%)	6 (60%)	4 (40%)
OR		13.0000	3.5000		2.8333
95% CI		0.5114 - 330.49 68	0.3715 - 32.9726		0.6315 - 12.7 129

GG: genotipo silvestre; GA: genotipo heterocigoto; AA: homocigoto mutado; OR: odds ratio \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Controles: Pacientes con SD en salud gingival.

En cuanto al polimorfismo RANTES-403 G/A en pacientes con SD con periodontitis I-II se observó una frecuencia del 19% (n=3) del WT (GG), 37% (n=6) para el HT(GA) y 44% (n=7) para el MT (AA) en los casos, en los controles se observó una frecuencia del 60% (n=3) del WT (GG) y un 60% (n=2) del MT (AA). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y alelos de los casos y los controles para este polimorfismo.

**Tabla 8.** Frecuencias genotípicas y alélicas de CCR5 G59029A de pacientes SD con periodontitis etapa I-II.

CCR5 G59029A					
	Frecuencias Genotípicas			Frecuencias Alélicas	
	GG	GA*	AA*	G	A**
<b>Casos</b>	2 (12%)	7 (44%)	7 (44%)	11 (34%)	21 (66%)
<b>Controles</b>	4 (80%)	1 (20%)	0 (0%)	9 (90%)	1 (10%)
OR		14.0000	27.0000		17.1818
95% CI		0.9441 - 207.6072	1.0432 to 698.83 22		1.9210 - 153.6815

GG: *genotipo silvestre*; GA: *genotipo heterocigoto*; AA: *homocigoto mutado*; OR: *odds ratio* \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Controles: *pacientes SD con salud gingival*.

Curiosamente para el polimorfismo CCR5 G59029A en pacientes con SD y periodontitis I-II se observó una frecuencia del 12% (n=2) del WT (GG), 44% (n=7) para el HT(GA) y 44% (n=7) para el MT (AA) en los casos, mientras que en los controles se observó una frecuencia del 80% (n=4) del WT (GG) , un 20% para el HT (GA) (n=1) y no se registra frecuencia genotípica del MT (AA).

Las frecuencias alélicas presentaron un 66% (n=21) en el alelo A y un 34% (n=11) en el alelo G en los casos y un 10% (n=1) del alelo A y un 90% (n=9) del alelo G en los controles. Se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) al analizar las frecuencias alélicas de este polimorfismo y un factor de riesgo de 17.18

veces (IC=1.9210 - 153.6815) a tener periodontitis etapa I-II en los pacientes SD con el alelo de riesgo A.

	TNF-308 G/A				
	Frecuencias Genotípicas			Frecuencias Alélicas	
	GG	GA	AA	G	A
<b>Casos</b>	15 (%)	1 (%)	0 (0%)	31 (%)	1 (%)
<b>Controles</b>	5 (%)	0 (%)	0 (%)	10 (%)	0 (%)
OR		1.0645	0.3548		1.0000
95%CI		0.0375 - 30.1973	0.0063 - 2 0.1420		0.0378 - 26.4693

**Tabla 9.** Frecuencias genotípicas y alélicas de TNF-308 G/A en pacientes SD con periodontitis etapa I-II.

GG: *genotipo silvestre*; GA: *genotipo heterocigoto*; AA: *homocigoto mutado*; OR: *odds ratio* \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . *Controles: pacientes SD con salud gingival.*

En el polimorfismo -308 G/A del gen TNF en pacientes con SD y periodontitis I-II, se observó una frecuencia del 94% (n=15) del WT (GG), un 6% (n=1) para el HT (GA), mientras que en los controles se observó una frecuencia del 100% (n=5) del WT (GG). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y alelos de los casos y los controles para este polimorfismo.

**Tabla 10.** Frecuencias genotípicas y alélicas de RANTES- 403 G/A en pacientes SD con periodontitis etapa III-IV.

RANTES-403 G/A					
	Frecuencias Genotípicas			Frecuencias Alélicas	
	GG	GA	AA	G	A
<b>Casos</b>	0 0(%)	4 (100%)	0 (0%)	4 (50%)	4 (50%)
<b>Controles</b>	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)	7 (70%)	3 (30%)
OR		21.0000	2.3333		2.3333
95% CI		0.6391 - 690. 0306	0.0298 - 182.9 241		0.3365 - 16 .1808

GG: genotipo silvestre; GA: genotipo heterocigoto; AA: homocigoto mutado; OR: odds ratio \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Controles: pacientes SD con salud gingival.

Para el polimorfismo del gen RANTES- 403 G/A en pacientes SD con periodontitis etapa III-IV, se observó una frecuencia del 100% ( $n=4$ ) para el HT (GA), mientras que en los controles se observó una frecuencia del 60% ( $n=3$ ) del WT (GG), 20% ( $n=1$ ) para el HT (GA) y 20% para el MT (AA). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y alelos de los casos y los controles para este polimorfismo.

**Tabla 11.** Frecuencias genotípicas y alélicas de CCR5 G59029A en pacientes SD con periodontitis etapa III-IV.

	CCR5 G59029A				
	Frecuencias Genotípicas			Frecuencias Alélicas	
	GG	GA	AA	G	A*
<b>Casos</b>	0 (0%)	1 (25%)	3 (75%)	1 (12%)	7 (88%)
<b>Controles</b>	2 (40%)	3 (60%)	0 (0%)	7 (70%)	3 (30%)
OR		2.1429	35.0000		16.3333
95% CI		0.0592 - 77.5408	0.5029 - 2435.8820		1.3489 - 197.7784

GG: genotipo silvestre; GA: genotipo heterocigoto; AA: homocigoto mutado; OR: odds ratio \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Controles: pacientes SD con salud gingival.

En el polimorfismo CCR5 G59029A en pacientes con SD y periodontitis III-IV se observó una frecuencia del 25% ( $n=1$ ) para el HT(GA) y un 75% ( $n=3$ ) para el MT (AA) en los casos, mientras que en los controles se observó una frecuencia del 40% ( $n=2$ ) del WT (GG) , un 60% ( $n=3$ ) para el HT (GA) y no se registra frecuencia genotípica del MT (AA).

Las frecuencias alélicas presentaron un 88% ( $n=7$ ) en el alelo A y un 12% ( $n=1$ ) en el alelo G en los casos, mientras que en los controles presentaron un 30% ( $n=3$ ) del alelo A y un 70% ( $n=7$ ) del alelo G. Se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) al analizar las frecuencias alélicas de este polimorfismo y un factor de riesgo de 16.33 veces (IC=1.0432 -698.831.3489 - 197.778422 a tener periodontitis etapa III-IV en los pacientes SD con el alelo de riesgo A.



**Tabla 12.** Frecuencias genóticas y alélicas de TNF-308 G/A en pacientes SD con periodontitis etapa III-IV.

	TNF-308 G/A				
	Frecuencias Genóticas			Frecuencias Alélicas	
	GG	GA	AA	G	A
<b>Casos</b>	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)
<b>Controles</b>	4 (67%)	0 (0%)	2 (33%)	8 (67%)	4 (33%)
OR		1.0000	0.2000		0.1111
95% CI		0.0161 - 62.3051	0.0073 - 5.4532		0.0051 - 2.3997

GG: genotipo silvestre; GA: genotipo heterocigoto; AA: homocigoto mutado; OR: odds ratio \*p<0.05, \*\*p<0.01. Controles: pacientes SD con salud gingival.

Por último, para el polimorfismo TNF-308 G/A en pacientes SD con periodontitis etapa III-IV, se observó una frecuencia del 100% (N=4) para el WT (GG) mientras que en los controles un 67% para el WT (GG) y el 33% de frecuencia para el MT (AA). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y alelos de los casos y los controles para este polimorfismo.

## 8. Discusión

Entre los meses de septiembre a noviembre del año 2019 se evaluó un total de 30 pacientes con SD y 30 sin SD. Al evaluar los parámetros periodontales (NIC, IP, IS) no se observaron mayores diferencias entre individuos con SD y sin SD tanto en salud periodontal como en periodontitis estadio I-II, mientras que en estadios III y IV, se observó una variación mayor en el IS ( $41,90 \pm 10,23$  sin SD;  $71,00 \pm 22,17$  con SD). La distribución del diagnóstico periodontal demostró que solo un 11% de los pacientes con SD presentaron salud periodontal, es decir, un estado caracterizado por una ausencia o niveles mínimos de inflamación clínica en un periodonto con estructuras de soporte normales, siendo un porcentaje relativamente bajo en comparación a los pacientes sin SD en donde un 33% contaba con salud periodontal, por lo demás no se observó una mayor diferencia en la distribución de los pacientes SD y sin SD para ningún estadio en particular. Por otra parte, se pudo detectar la presencia de *P. gingivalis* en los sacos o sitios de mayor profundidad en muestras de microbiota subgingival de todos los pacientes y, en todos los grupos descritos previamente, no se detectaron diferencias en la carga de *P. gingivalis*. A partir de las muestras de FCG de todos los pacientes se cuantificaron los niveles de secreción de distintas citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17A, e IL-21) y al comparar los niveles de las distintas citoquinas cuantificadas en los FGC de las personas con SD con las obtenidas de sujetos sin SD, no se detectaron mayores diferencias. Al mismo tiempo, se detectaron y cuantificaron los siguientes polimorfismos de interés: RANTES-403 G/A, CCR5 G59029A y TNF-308 G/A, en pacientes con y sin SD. Para el polimorfismo G59029A del gen CCR5 se observó una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) al analizar las frecuencias alélicas de este polimorfismo y un factor de riesgo de 17.18 veces a tener periodontitis etapa I-II en los pacientes SD con el alelo de riesgo A. Mientras que el riesgo de tener periodontitis etapa III-IV en pacientes SD con el mismo alelo de riesgo fue de 16.33 veces. En cuanto al resto de los polimorfismos estudiados, no se encontraron diferencias significativas para frecuencias genotípicas y/o alélicas tanto para casos como controles.

En la presente investigación como resultado de la evaluación periodontal de pacientes con SD y sin SD, se observó que los pacientes con periodontitis estadio III-IV y SD presentaron un mayor IS e IP en comparación con los pacientes sin SD

de los mismos estadios. La diferencia de IP entre ambos grupos es menor, y no se puede considerar para llegar a una conclusión respecto al desarrollo de la enfermedad periodontal para ninguno de los grupos estudiados. En tanto el IS, cuya diferencia es mayor, sí se podría considerar para determinar alguna diferencia clínica entre los grupos, sin embargo, el índice de sangrado por sí solo no es un factor que establezca mayor inflamación en la enfermedad periodontal. En efecto, así lo indica Botero & Bedoya, estableciendo que el índice de sangrado al sondaje debe ser interpretado cuidadosamente y analizado en conjunto con los demás parámetros clínicos ya que su presencia no es un indicativo absoluto de enfermedad (Botero.J & Bedoya.E, 2010). De esta manera, este índice no es representativo, por sí solo, para determinar que los individuos con SD poseen mayor inflamación periodontal que aquellos sin SD en etapas más avanzadas de la enfermedad periodontal (estadios III y IV).

Por otro lado, a partir de muestras de microbiota de sujetos sanos y pacientes con periodontitis afectados o no de SD, se detectó la presencia de *P. gingivalis* mediante la cuantificación de la subunidad ribosomal 16S y, curiosamente, en todos los grupos descritos previamente tanto para salud periodontal como para periodontitis en sus distintos estadios, no se detectaron diferencias en la carga de *P. gingivalis* en pacientes con y sin SD. Amano y cols, en su estudio de la relación de bacterias periodonto-patógenas y la aparición temprana de la periodontitis en individuos con SD, concluyeron que no existían diferencias significativas observadas en la frecuencia de detección para ninguna de las especies estudiadas, entre ellas *P. gingivalis*, tanto para individuos SD como para los controles sin SD, sin embargo las prevalencias relativas de *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *P. intermedia* fueron significativamente más altas en el grupo de individuos SD con periodontitis, en comparación con el grupo SD con gingivitis (Amano & cols., 2001). Años más tarde, un estudio consideró a 45 pacientes con SD y periodontitis (P-SD) y 30 SD sin periodontitis (H-SD) con el fin de caracterizar cuatro bacterias periodontales en ambos grupos (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans*). De las tres bacterias del complejo rojo, el resultado fue estadísticamente mayor en el P-SD que en el H-SD (47% vs 17%), mientras que, por el contrario, el H-SD reportó con mayor frecuencia la ausencia de todas ellas (20%) o *T. forsythia* sola

(20%) (Martinez & cols., 2013). Si bien no existen mayores diferencias en la frecuencia de detección de carga de periodonto-patógenos en individuos con periodontitis afectados o no de SD, sí existen diferencias en la composición de la microbiota en la misma población SD, dependiendo de su diagnóstico periodontal (sanos, gingivitis o periodontitis). Esto podría indicar que la periodontitis que afecta a las personas con SD, podría ser consecuencia de un proceso disbiótico causado principalmente por el aumento de bacterias del complejo rojo, y no relacionarse necesariamente con un proceso de inflamación local o sistémico propiamente tal.

A partir de la cuantificación de citoquinas pro-inflamatorias del FGC de los pacientes, los niveles de IL-1 $\beta$  y IL-12 que se observaron en pacientes con SD parecieran ser mayores tanto en salud, como en periodontitis estadio I-II y III-IV. Estos valores fueron similares a los obtenidos en el estudio de Tsilingaridis & cols., (2011) en donde los niveles de IL-1 $\beta$  y IL-12 fueron significativamente mayores en sujetos con SD comparados con controles sin SD. En efecto, el nivel aumentado de citoquinas relacionadas con linfocitos T colaboradores (del inglés *T helper*, Th) en FGC de sujetos con SD podría ser el resultado de la inflamación crónica en el tejido periodontal o una consecuencia de anormalidades en el sistema inmune innato y adquirido (Tsilingaridis & cols., 2011). Al mismo tiempo, los niveles de IL-4 fueron significativamente mayores en pacientes con SD y periodontitis estadio III-IV. Cetiner demostró que el aumento de los niveles de las citoquinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-10) se relaciona con una alta frecuencia de infección recurrente en sujetos con SD (Cetiner & cols., 2010). Aun así, al comparar los niveles de las distintas citoquinas cuantificadas en los FGC de las personas con SD con las obtenidas de sujetos sin SD, no se detectaron mayores diferencias significativas. Así, se podría determinar que los individuos afectados de SD y periodontitis no presentaron mayores niveles de inflamación que pacientes con SD y sin periodontitis. Por otra parte, los niveles de citoquinas fueron medidas a partir del FGC, lo que nos indicaría el nivel de inflamación en el medio local, más no podemos determinar efectivamente si existen diferencias a nivel sistémico de inflamación tanto en individuos con SD como sin SD. Curiosamente, el SD podría implicar un estado pro-inflamatorio crónico a nivel sistémico siendo esta población más susceptible al desarrollo y/o avance de periodontitis. Un estudio de metaanálisis que examinó citoquinas

circulantes en niños y adultos SD, concluyó que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  estaban elevados significativamente. Estos mediadores se asocian con el desarrollo de inflamación crónica y enfermedad autoinmune, las que son comunes en nuestra población de interés (Huggard & cols., 2020). Trabajos recientes demuestran la presencia de una constante activación de la respuesta de interferón (IFN) en individuos con SD. En efecto, una consistente sobre-expresión e hiperactivación de la respuesta transcripcional del IFN se han observado en diferentes tipos de células, mientras que por el lado de las proteínas, se describe un aumento en la expresión de los receptores de IFN en conjunto con hipersensibilidad al IFN- $\alpha$ . La sobre-expresión de los receptores de IFN, entre los cuales cuatro de los seis son codificados por genes ubicados en el cromosoma 21, está presente a través de todo el sistema inmunológico. En respuesta a la estimulación con IFN, las células inmunitarias de los individuos con SD son hipersensibles y presentan una hiperactivación de la señalización posterior específica del tipo de cascada celular. Este aumento de la señalización del interferón se ha ligado a importantes cambios proteómicos circulantes que son indicativos de auto-inflamación crónica y que podrían encajar en el alcance de otras afecciones inflamatorias (Gensous & cols., 2020). Estudios recientes otorgan el término CLIP (Chronic Low-grade Inflammatory Phenotype) para referirse a un proceso inflamatorio crónico fisiopatológico que cumple un rol importante en la patogénesis de muchas condiciones de carácter crónico. A diferencia de las respuestas inflamatorias definidas tradicionalmente, CLIP representa un rasgo inflamatorio crónico que carece de localización o estímulo antigénico aparente (Chen & cols., 2019). No existen actualmente estudios que relacionen este CLIP a la condición de SD, aun así sería de vital importancia abordar futuras investigaciones que demuestren si existe este tipo de fenotipo en la población SD y su posible asociación con la enfermedad periodontal.

Por otro lado, el receptor de quimioquinas CCR5 se expresa en la superficie de macrófagos/monocitos y linfocitos T activados. Entre sus ligandos se encuentra RANTES o CCL5, que puede ser producido por fibroblastos, células endoteliales, monocitos/macrófagos, osteoblastos y mastocitos (Silva & cols., 2009). En células sanguíneas mononucleares como linfocitos y monocitos, el genotipo AA del polimorfismo CCR5 G59029A se ha informado que aumenta la expresión de CCR5,

así como genera alteraciones en la capacidad de unión a su ligando (RANTES/CCL5) (Carpenter & cols.,2014; Henckaerts & cols., 2007). El polimorfismo G59029A condiciona hasta dos veces el aumento en la expresión de CCR5 (Gamonal & cols.,2001; Bokars & cols.,2009) lo que podría afectar en el desarrollo de periodontitis en la población que posea este genotipo. Además, el alelo de riesgo A de este polimorfismo se asocia a periodontitis, ya que el receptor CCR5 está relacionado con la diferenciación de osteoclastos que actúan directamente sobre el tejido óseo que sostiene el diente (Savarrío & cols., 2007). En el presente estudio se observó una asociación de los genotipos A/A y G/A ( $p < 0.01$ ) del polimorfismo G59029A con un factor de riesgo de 27 y 14 veces respectivamente a periodontitis (etapa I-II) en pacientes SD, mientras que al analizar las frecuencias alélicas de este polimorfismo se observó un factor de riesgo de 16.33 veces a desarrollar periodontitis etapa III-IV en los pacientes SD con el alelo de riesgo A. Resultados similares se obtuvieron al analizar el polimorfismo G59029A del gen CCR5 y su asociación con periodontitis crónica, en donde los genotipos más frecuentes para el polimorfismo CCR5 G59029A para el grupo con periodontitis fueron G/A (47,4%) y A/A (47,4%) (Martinez & cols.,2018). Es necesario destacar que los grupos controles en la detección de frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos corresponden en su mayoría a pacientes SD con salud gingival, por lo que no sería correcto asociar la presencia de este polimorfismo a la condición de SD, e incluso al analizar el mismo polimorfismo CCR5 G59029A en pacientes con o sin SD y salud gingival, no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos y alelos de los casos y los controles. Existen estudios que afirman que la unión del ligando a CCR5 puede proporcionar una señal importante para la inducción de la síntesis de IL-12 por el subconjunto CD8 $\alpha^+$  de células dendríticas (Aliberti & cols., 2000). Curiosamente en este estudio, los niveles de IL-12 en personas SD con periodontitis estadio I-II y III-IV se encuentran aumentados, lo que podría sugerir la posible asociación de la presencia del polimorfismo G59029A del gen de CCR5, con el aumento de CCR5 y la consecuente inducción de síntesis de IL-12. Sería así de gran interés para futuras investigaciones asociar los polimorfismos de riesgo en la periodontitis a citoquinas claves en la enfermedad periodontal.

En cuanto a las limitaciones del presente trabajo de investigación, se debe considerar que la clasificación diagnóstica de las enfermedades periodontales cambia constantemente, lo que dificulta comparar tanto etapas de la enfermedad periodontal, diagnósticos e índices de evaluación periodontal en los distintos trabajos publicados antes del 2018, fecha en la que se publica la nueva clasificación de enfermedades periodontales y peri-implantarias y con la que actualmente se evalúa a los pacientes. Se sugiere realizar más trabajos que evalúen parámetros clínicos de enfermedad periodontal en pacientes con SD con la clasificación más reciente. Por otro lado, la cantidad de estudios que evalúan los parámetros periodontales y su asociación con la condición de SD aún son escasos y algunos muy antiguos. De estos, los que incluyen el estudio de mediadores inflamatorios y genética son aún más escasos lo que dificulta la comparación de resultados del presente trabajo con otros existentes. Por otra parte, el tamaño muestral del presente trabajo no logra ser representativo de toda la población afectada de esta condición, lo que no nos permite tener una validez externa. Sin embargo, como un primer trabajo, nos permite tener una primera aproximación para poder direccionar las futuras investigaciones, con el objetivo de comprender más la relación existente entre el SD y la periodontitis.

Además, tener conocimiento respecto a los factores que pueden influir en la aparición y progresión de la enfermedad periodontal en la población con SD es de gran utilidad tanto para su prevención como para planificar un tratamiento exitoso. Considerando que actualmente la exigencia de bases genéticas para la explicación de muchas enfermedades se ha hecho más evidente, el estudio de polimorfismos de genes involucrados en la respuesta inflamatoria de estos pacientes podría explicar por qué a pesar de tener la mayor cantidad de factores controlados (higiene, profilaxis, tratamiento no quirúrgico y quirúrgico, apoyo familiar, etc...) no se obtiene el resultado esperado. La detección de polimorfismos como RANTES-408 G/A, CCR5 G59029A y TNF-308 G/A en los pacientes, nos advierte de un mayor riesgo frente a la periodontitis. Así, el manejo en la terapia periodontal podría incluir sesiones más seguidas de profilaxis, pulido y alisado radicular con el fin de lograr el éxito terapéutico, no solo en población SD sino que en todos aquellos pacientes que presenten polimorfismos de riesgo.

## 9. Conclusiones

1. Como resultado de la evaluación periodontal de pacientes con SD y sin SD, no se observó mayor frecuencia para ningún estadio en particular: salud gingival, periodontitis estadio I-II o III-IV. Los pacientes con SD presentaron mayor IS e IP en comparación con pacientes sin SD en los mismos estadios, sugiriendo un mayor componente inflamatorio local.
2. Existen mayores niveles de producción de IL-1 $\beta$  e IL-12 en pacientes con SD y periodontitis estadio III-IV y de IL-6 e IL-12 en pacientes con SD y periodontitis estadio I-II en comparación a sus respectivos controles. Además, no se detectaron diferencias en la carga de *P. gingivalis*.
3. La presencia del polimorfismo CCR5 G59029A en pacientes con SD se asocia a un alto riesgo a desarrollar periodontitis tanto para estadios tempranos (I -II), como para estadios más tardíos (III-IV).
4. En pacientes SD con salud gingival no existen diferencias respecto a los niveles de mediadores pro-inflamatorios detectados en FGC en comparación a pacientes sin SD para el mismo diagnóstico periodontal. Tampoco existen diferencias en la cuantificación de polimorfismos. En pacientes con SD con periodontitis (I-II y III-IV), IL-1 $\beta$  e IL-12 son mayores significativamente en comparación a pacientes sin SD. Para este mismo grupo la cuantificación de polimorfismos refleja una asociación entre el alelo de riesgo A del gen CCR5 G59029A y pacientes SD con periodontitis.



## 10. Referencias Bibliográficas

- Amano, A., Murakami, J., Akiyama, S., & Morisaki, I. (2008). Etiologic factors of early-onset periodontal disease in Down syndrome. *Japanese Dental Science Review*, 44(2): 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2008.07.001>
- Amano, A., Kishima, T., Kimura S., Takiguchi, M., Oshima, T., Hamada, S. (2000). Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J Periodontol*, 71(2) 249–255. doi: 10.1902/jop.2000.71.2.249 PMID: 10711615
- Alba, E., Barrera, A., Guadalupe, N., Adilene, K., & Bonifaz, A. (2020). Onicomycosis y síndrome de Down: asociación micológica frecuente. *Dermatología Revista Mexicana*, 64(3): 359–361.
- Aliberti, J., Reis e Sousa, C., Schito, M., Hieny, S., Wells, T., Huffnagle, G. B., & Sher, A. (2000). CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nature immunology*, 1(1), 83–87. <https://doi.org/10.1038/76957>
- Arriola, F. (2020). Marcadores moleculares asociados a enfermedad de Alzheimer en personas con síndrome de Down. Tesis conducente al grado de Maestría en Odontopediatría, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México.
- Asim, A., Kumar, A., Muthuswamy, S., Jain, S., & Agarwal, S. (2015). Down syndrome: An insight of the disease. *Journal of Biomedical Science*, 22 (41): 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0138-y>
- Ataoğlu, T., Ungör, M., Serpek, B., Haliloğlu, S., Ataoğlu, H., & Ari, H. (2002). Interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha levels in periapical exudates. *International endodontic journal*, 35(2), 181–185. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2002.00467.x>
- Bartold, P., & Van Dyke, T. (2013). Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts. Periodontology 2000*, 62(1), 203–217. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00450.x>
- Borkar, M., Tripathi, G., Sharma, RK., Sankhwar, SN., Agrawal, S. (2011) Chemokine (CCR) and fractalkine (CX3CR) receptors and end stage renal disease. *Inflamm Res*. 60(4): 399-407.

- Botero, J., & Bedoya, E. (2010). Determinantes del Diagnóstico Periodontal. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral.* 3(2); 94-99. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-01072010000200007>
- Carpenter, D., Taype, C., Goulding, J., Levin, M., Eley, B., Anderson, S., Shaw, MA., Armour, JA. (2014). CCL3L1 copy number, CCR5 genotype and susceptibility to tuberculosis. *BMC Med Genet* (15): 5.
- Carrillo de Albornoz, A., García, A., & Bascones, A. (2006). Papel de la IL-6 y TNF-alfa en la enfermedad periodontal. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 18(2), 83-89.
- Casas, Lilian & Gómez, Alberto. (2008). Asociación de polimorfismos genéticos de FNT-a e IL-10, citocinas reguladoras de la respuesta inmune, en enfermedades infecciosas, alérgicas y autoinmunes. *Infectio*, 12(1), 38-53
- Cavalcante, L., Tanaka, M., Pires, J., Apponi, L., Aparecida, E. M., Valentini, S. R., Palomari, D. M., Capela, M. V., Rossa, C., & Scarel-Caminaga, R. M. (2012). Expression of the interleukin-10 signaling pathway genes in individuals with Down syndrome and periodontitis. *Journal of periodontology*, 83(7), 926–935. <https://doi.org/10.1902/jop.2011.110056>
- Cavalla, F., Claudino, M., Varise, E., Espindola, A., Repeke, C., Martins, W. & Garlet, G. (2015). La modulación de la expresión de IL-10 por el polimorfismo IL-10-592C/A (rs1800872) es independiente de la presencia y carga bacteriana de los periodontopatógenos clásicos. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 8(2): 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.piro.2015.03.004>
- Cekici, A., Kantarci, A. & Hasturk, H. (2014) Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 64(12):57–80. <https://doi.org/10.1111/prd.12002>
- Cetiner, S., Demirhan, O., Inal, T. C., Tastemir, D., & Sertdemir, Y. (2010). Analysis of peripheral blood T-cell subsets, natural killer cells and serum levels of cytokines in children with Down syndrome. *International journal of immunogenetics*, 37(4), 233–237. <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2010.00914.x>

- Chen, Y., Liu, S., & Leng, S. (2019). Chronic Low-grade Inflammatory Phenotype (CLIP) and Senescent Immune Dysregulation. *Clinical Therapeutics*, 41 (3): 400-409.
- Cutress, T. W., Brown, R. H., & Guy, E. M. (1970). Occurrence of some bacterial species in the dental plaque of trisomic 21 (mongoloid), other mentally retarded, and normal subjects. *The New Zealand dental journal*, 66(304), 153–161
- Demicheri, A. & Batlle, A. (2011). La enfermedad periodontal asociada al paciente con síndrome de Down. *Odontoestomatología*, 13(18): 4–15.
- Deps, T., Angelo, G. L., Martins, C. C., Paiva, S. M., Pordeus, I. A., & Borges-Oliveira, A. C. (2015). Association between dental caries and down syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Plosone*,10(6): 1-9 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127484>
- Díaz, J., Melgar, S., Rojas, L., Álvarez, C., Monasterio, G., Carvajal, P., & Vernal, R. (2017). Increased levels of the T-helper 2-associated cytokine (interleukin-22) and transcription factor (aryl hydrocarbon receptor) in patients with periodontitis are associated with osteoclast resorptive activity and severity of the disease. *Journal of Periodontal Research*, 52(5): 893–902. <https://doi.org/10.1111/jre.12461>
- Díaz, J., Melgar, S., Alvarez, C., Monasterio, G., Benítez, A., Ciuchi, P., Díaz, C., Mardones, J., Escobar, A., Sanz, M., & Vernal, R. (2015). T-lymphocyte phenotype and function triggered by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is serotype-dependent. *Journal of Periodontal Research*, 50(6): 824–835. <https://doi.org/10.1111/jre.12270>
- Díaz, J., Yáñez, J., Alvarez, C., Melgar, S., Hernández, M., Sanz, M., & Vernal, R. (2014). Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(3): 242–251. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12205>
- Díaz, J., Muñoz, Y., Melgar, S., More, J., Bruna, B., Lobos, P., Monasterio, G., Vernal, R., & Paula-Lima, A. (2019). Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* triggers pro-inflammatory responses and amyloid

beta secretion in hippocampal cells: a novel link between periodontitis and Alzheimer's disease?, *Journal of Oral Microbiology*, 11(1): 1-9.  
<https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1586423>

- Díaz , J., Yáñez , J., Melgar, S., Álvarez, C., Rojas, C., & Vernal, R. (2012). Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 5(1): 40–45.  
<https://doi.org/10.4067/s0719-01072012000100007>
- Faria, C., Almeida, F., Evangelista, D., Lopes, K., Ribeiro L., Almeida, R. (2016) Salivary Periodontopathic Bacteria in Children and Adolescents with Down Syndrome. *Plosone*, 11(10): e0162988. doi:10.1371/journal.pone.0162988
- Fernández, D. (2016). Aspectos Generales Sobre El Síndrome De Down. *Revista Internacional de Apoyo a La Inclusión, Logopedia, Sociedad y Multiculturalidad*, 2(1): 33–38.
- Frydman, A. & Nowzari, H. (2012). Down syndrome-associated periodontitis: a critical review of the literature. *Compendium of continuing education in dentistry*, 33 (5): 356–361.
- Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodontal Res* 2001; 36(3): 194-203.
- Garrido, M., Ordenes, T., Segú, C., Baeza, M., García-Sesnich, J., & Hernández, M. (2011). Asociación entre niveles de TNF-a en fluido crevicular gingival de dientes con periodontitis apical asintomática. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 4(3),130-133.
- Gensous, N., Bacalini, M.G., Franceschi, C. (2020). Down syndrome accelerated aging and immunosenescence. *Semin Immunopathol* 42, 635–645  
<https://doi.org/10.1007/s00281-020-00804-1>

- Hajishengallis, G. (2014). The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Molecular Oral Microbiology*, 29(6): 248–257. <https://doi.org/10.1111/omi.12065>
- Herrera, J., & Cifuentes, L. (2011). Estudio epidemiológico global del síndrome de down. *Revista Chilena de Pediatría*, 82(2): 105–112. <https://doi.org/10.4067/S0370-41062011000200004>
- Herrera, D., Retamal-Valdes, B., Alonso, B., & Feres, M. (2018). Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. *Journal of clinical periodontology*, 45 (20): 78–94. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12941>
- Huggard, D., Doherty, DG & Molloy, EJ. (2020). Immune Dysregulation in Children With Down Syndrome. *Front. Pediatr.* (8)73. doi: 10.3389/fped.2020.00073
- Henckaerts, L., Fevery, J., Van Steenberghe, W., Verslype, C., Nevens, F., Yap, P., Roskams, T., Rutgeerts, P., Vermeire, S.(2007) The RANTES –28 G polymorphism is associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2007; 56(6): 891-892.
- Ide, M., Harris, M., Stevens, A., Sussams, R., Hopkins, V., Culliford, D., Fuller, J., Ibbett, P., Raybould, R., Thomas, R., Puenter, U., Teeling, J., Perry, V. H., & Holmes, C. (2016). Periodontitis and cognitive decline in Alzheimer's disease. *PLOS ONE* 11(3): 1-9.
- Izumi Y, Sugiyama S, Shinozuka O, Yamazaki T, Ohyama T, Ishikawa I. (1989) Defective neutrophil chemotaxis in Down's syndrome patients and its relationship to periodontal destruction. *J Periodontol* (60) 238-42.
- Katuska, D., Guerrero, R., Rafael, M., Clavería, A., Li, C., Peña, M. M., Iii, S., Bruno, J., & Alfonso, Z. (2015). Algunas características clínico epidemiológicas del síndrome de Down y su repercusión en la cavidad bucal. *Medisan*, 19 (10).
- Khocht, A (2011). Down Syndrome and Periodontal Disease, Genetics and Etiology of Down Syndrome, edited by Subrata Dey. <https://doi.org/10.5772/736>.
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature reviews. Disease primers*. 3 (17038): 1-10. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>

- Kornman, K., & di Giovine, F. (1998). Genetic variations in cytokine expression: risk factor for severity of adult periodontitis. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*, 3(1): 327–338. <https://doi.org/10.1902/annals.1998.3.1.327>.
- Levin S. (1987). El sistema inmune y la susceptibilidad frente a las infecciones en el síndrome de Down. *Clin Bio Res*. 246: 461-468.
- Marakoglu, I., Gursoy, U. K., Marakoglu, K., Cakmak, H., & Ataoglu, T. (2008). Periodontitis as a risk Factor for preterm low birth weight. *Yonsei Medical Journal*, 49(2): 200–203. <https://doi.org/10.3349/ymj.2008.49.2.200>
- Martinez-Martinez R, Loyola-Rodriguez J, Bonilla-Garro S, Patiño-Marin N, Haubek D, Amano A (2013) . Characterization of periodontal biofilm in Down syndrome patients: a comparative study. *J Clin Pediatr Dent* 2013; 37: 289–295. doi: 10.17796/jcpd.37.3.d70710016518p58n PMID: 23855174
- Melgar, S., Díaz, J., Alvarez, C., Rojas, L., Monasterio, G., Carvajal, P., Escobar, A., Sanz, M., & Vernal, R. (2016). Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* increases osteoclast and memory T-lymphocyte activation. *Molecular Oral Microbiology*, 31(2): 162–174. <https://doi.org/10.1111/omi.12112>
- Monasterio, G., Fernández, B., Castillo, F., Rojas, C., Cafferata, E. A., Rojas, L., Alvarez, C., Fernández, A., Hernández, M., Bravo, D., & Vernal, R. (2019). Capsular-defective *Porphyromonas gingivalis* mutant strains induce less alveolar bone resorption than W50 wild-type strain due to a decreased Th1/Th17 immune response and less osteoclast activity. *Journal of Periodontology*, 90(5): 522–534. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0079>
- Morinushi T, Lopatin DE, Van Poperin N. The relationship between gingivitis and the serum antibodies to the microbiota associate with periodontal disease in children with Down's Syndrome. *J Periodontol* 1997; 68: 626–31. doi: 10.1902/jop.1997.68.7.626

- Mubayrik, A. (2016). The Dental Needs and Treatment of Patients with Down Syndrome. *Dental Clinics of North America*, 60(3): 613–626. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2016.02.003>
- Pini, D., Fröhlich, P., & Rigo, L. (2016). Oral health evaluation in special needs individuals. *Einstein Sao Paulo*, 14(4): 501–507. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082016AO3712>
- Nateghi Rostami M, Douraghi M, Miramin Mohammadi A, Nikmanesh B. Altered serum pro-inflammatory cytokines in children with Down's syndrome. *Eur. Cytokine Netw.* 2012; 23(2): 64-7 doi:10.1684/ecn.2012.0307
- Navas, R. & Mogollón, J. (2007). Participación de los padres en el cuidado de la salud bucal de los niños y adolescentes con síndrome de Down. *Ciencia Odontológica*, 4(2),130-140
- Raunio, T., Nixdorf, M., Knuuttila, M., Karttunen, R., Vainio, O., & Tervonen, T. (2007). The extent of periodontal disease and the IL-6 -174 genotype as determinants of serum IL-6 level. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(12): 1025–1030. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01151.x>
- Ruiz , L., Cruz, J. A., Carrillo, B. A., Valencia G., Valadez N., & Manuel, V. (2021). Asociación del polimorfismo -174 G > C del gen IL-6 en pacientes con periodontitis estadio II grado B. *Revista Biomédica*, 32(2): 78-86.
- Roba, I., Elena ZS., de los Ángeles, DM., Gustavo S. (2018) Prevalence of Periodontal Disease in Young Adults with Down Syndrome. *J Oral Health Dent.* 2:304.
- Rodriguez, K., Clavería, R., Peña, M. (2015) Algunas características clínico epidemiológicas del síndrome de Down y su repercusión en la cavidad bucal. *Medisan*, 19(10): 1272-1280.
- Sansores, L., Carrillo-Avila, A., Sauri-Esquivel, E., (2017) Cuantificación de la quimiocina CCL5 en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y/o periodontitis crónica: Estudio preliminar. *Odovtos-Int J Dent Sc.* 19(2):71-78.

- Savarrio, L., Donati M., Carr, C., Kinane, DF., Berglundh, T. (2007). Interleukin-24, RANTES and CCR5 gene polymorphisms are not associated with chronic adult periodontitis. *J Periodontal Res* 2007; 42(2): 152-158
- Sakellari, D., Arapostathis, K.N. & Konstantinidis, A. (2005). Periodontal conditions and subgingival microflora in Down syndrome patients. A case-control study. *J Clin Periodontol.* (32) 6: 684-690.
- Scalioni, F., Carrada, C., Martins, C., Ribeiro, R., & Paiva, S. (2018). Periodontal disease in patients with Down syndrome: A systematic review. *Journal of the American Dental Association*, 149(7): 628-639. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2018.03.010>
- Soler G., (2021). Implicaciones clínicas de las quimiocinas y sus receptores en la medicina transfusional y el trasplante, 37(1): 3.
- Shao, M. Y., Huang, P., Cheng, R., & Hu, T. (2009). Interleukin-6 polymorphisms modify the risk of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 10(12), 920–927. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0920279>
- Stein Duker, L. I., Richter, M., Lane, C. J., Polido, J. C., & Cermak, S. A. (2020). Oral Care Experiences and Challenges for Children with Down Syndrome: Reports From Caregivers. *Pediatric dentistry*, 42(6), 430–435.
- Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* 2007; 86(4): 306-319.
- Tsilingaridis, G., Yucel-Lindberg, T., & Modéer, T. (2012). T-helper-related cytokines in gingival crevicular fluid from adolescents with Down syndrome. *Clinical Oral Investigations*, 16(1): 267–273. <https://doi.org/10.1007/s00784-010-0495-6>
- Vernal, R., Díaz, J., Melgar, S., Pujol, M., Diaz, E., Silva, A., Sanz, M., & Garcia-Sanz, J. (2014). Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(5): 451–459. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12236>
- Vernal, R., Dutzan, N., Chaparro, A., Puente, J., Valenzuela, M. A., & Gamonal, J. (2005). Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis.



Journal of Clinical Periodontology, 32(4): 383–389.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00684.x>

- Vernal, R., Díaz, J., Melgar, S., Pujol, M., Diaz, E., Silva, A., Sanz, M., & Garcia-Sanz, J. A. (2014). Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype dependant. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(5): 451–459. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12236>
- Vernal, R., León, R., Silva, A., Van Winkelhoff, A. J., Garcia-Sanz, J. A., & Sanz, M. (2009). Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(10): 823–829. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01462.x>
- Vernal, R., Velásquez, E., Gamonal, J., Garcia-Sanz, J. A., Silva, A., & Sanz, M. (2008). Expression of proinflammatory cytokines in osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Archives of Oral Biology*, 53(10): 910–915. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.04.004>
- Yoshihara, T., Morinushi, T., Kinjyo, S., & Yamasaki, Y. (2005). Effect of periodic preventive care on the progression of periodontal disease in young adults with Down's syndrome. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(6): 556–560. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00712.x>

## 11. Anexos

### 11.1. Anexo N°1

68

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO Y VOLUNTARIO

CON FUNDAMENTO EN LA LEY GENERAL DE SALUD.  
TÍTULO QUINTO Y CAPÍTULO ÚNICO, INVESTIGACIÓN PARA  
SALUD ARTÍCULO 100 FRACCIÓN IV, ARTÍCULOS 102 Y 103.  
NOM-168-SSA1-1998, DEL EXPEDIENTE CLÍNICO EN SU NUMERAL 4.2

#### Carta de consentimiento informado bajo información de una Investigación clínica

Título del protocolo: MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN PERSONAS CON SÍNDROME DE DOWN

Investigador principal: Arriola F.

Sede del estudio: Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

A través de este medio, se le informa y se le invita a participar en el presente estudio que se lleva a cabo durante el periodo de Abril 2019 a Febrero 2020. Usted ha sido seleccionado para el estudio debido a su participación en el programa de pacientes de la Unidad de Posgrado e Investigación de Odontología Infantil. Toda información recolectada en este será utilizada exclusivamente por el investigador con fines de aprendizaje científico. La información personal recolectada será de carácter confidencial, utilizándose solamente los datos de edad, afección periodontal, y los resultados recolectados en las muestras tomadas con la saliva y el líquido crevicular. Se pedirá que los pacientes acudan a una revisión, en la cual se tomarán muestras de líquido crevicular y pedirá al paciente escupir saliva en un tubo para el procesamiento de la muestra. Se debe mencionar, que es un estudio que será pagado por el investigador, mas no habrá remuneración monetaria a los participantes estudio. No existe ningún riesgo al participar en el estudio, ya que no habrá ninguna invasión por parte del investigador. Al igual, como participante usted tiene el derecho de renunciar el estudio y reusarse a proporcionar información de cualquier índole.

Yo....., expreso consentimiento para que el alumno Fabio Gregorio Arriola Pacheco, realice en mi persona y/o mi hijo/a, según sea el caso. He sido informado convenientemente en forma detallada y suficiente, comprendiendo en su totalidad sobre el tipo de tratamiento de efectuarse en mí, habiéndome explicado detalladamente los objetivos de la investigación aceptando en su totalidad por mi parte la propuesta ofrecida.

Fecha \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_ paciente o \_\_\_\_\_ tutor

Nº de Documento \_\_\_\_\_

## 11.2. Anexo N°2



### NOTIFICACIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA

**Título del proyecto:** Relación de las características de la saliva con la severidad de caries infantil en población pediátrica con síndrome de Down de Yucatán.

**Patrocinador:** PAIIFO.

**No. de registro del CEI:** FODO-2017-0005

**Investigador Responsable:** Dra. Leonor Pinzón Té

**Recibido:** junio 26, 2018.

**Fecha de notificación:** noviembre 13, 2018.

El proyecto ha sido debidamente revisado por el Comité de Bioética del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", de la Universidad Autónoma de Yucatán, en cuanto a su valor social, científico, validez científica, relación riesgo-beneficio, hoja de información, competencia del personal responsable e infraestructura disponible. La investigadora responsable se compromete a seguir los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial 1964, con las modificaciones realizadas en Tokio 1975, Venecia 1983, Hong Kong 1989, Sudáfrica 1996 y Edimburgo 2000, así como a lo establecido en el Artículo 7 del Convenio Internacional de Derechos Civiles y Políticos de La Asamblea General de las Naciones Unidas de 1986 y el Reglamento de la Ley General en Salud en Materia de Investigación para la salud publicado en el Diario Oficial de la Federación el 6 de enero de 1987. Con base en todo lo anterior el presente proyecto queda **APROBADO**.

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, which appears to read "Fernando J. Andrade-Narváez", is shown on a light-colored rectangular background.

Dr. Fernando J. Andrade-Narváez.

Presidente del Comité de Bioética del CIR-UADY

ccp: Mtro. Efraín Poot Capetillo, Coordinador Académico del CIR, UADY.

ccp: archivo del CEI-CIR-UADY

### 11.3. Anexo N°3



**Universidad Autónoma De Yucatán  
Facultad de Odontología**

**Departamento de Especialización en  
Periodoncia**

Mérida, Yucatán a 9 de julio de 2021

A quien corresponda.

Estimados, junto con saludar escribo para informarles que nuestra Institución posee un comité ético científico a cargo de revisar, aprobar o rechazar los proyectos de investigación asociados a tesis de pregrado, postítulo, postgrado y de investigadores de nuestra Universidad. La aprobación autorizada por esta entidad se realiza en base al análisis exhaustivo de cada de estos proyecto, el cual, al ser aprobado se emite el certificado del comité. En ese contexto, cada certificado identifica el nombre del proyecto y autoriza la ejecución de toda la metodología declarada.

El certificado emitido con fecha 13 de noviembre de 2018, con N° de registro CEI FODO-2017-005, para el proyecto titulado "*Relación de las características de la saliva con la severidad de caries infantil en población pediátrica con síndrome de Down de Yucatán*", autoriza a la ejecución de toda la metodología declarada. Esto es, el examen odontológico de personas afectadas con Síndrome de Down que se atienden en la clínica odontológica del programa de Maestría de Odontología Pediátrica y del Programa de Especialización en Periodoncia, el tratamiento que le corresponda y la toma de muestras de saliva, fluido crevicular gingival y microbiológicas. Conforme a la metodología planteada, el proyecto permite estudiar los antecedentes clínicos odontológicos y el uso de las muestras biológicas para determinar la presencia de bacterias orales, marcadores de inflamación, deterioro cognitivo, enfermedades autoinmunes, polimorfismos o marcadores de progresión de la enfermedad periodontal o de caries.

Se extiende el presente documento para los fines que se estimen convenientes.

Atentamente,

\_\_\_\_\_  
Dr. Víctor M. Martínez Aguilar  
Coordinador

## 11.4. Anexo N°4



Santiago, 12 de julio de 2021

Mat.: Inscripción Proyecto en DIFO.

Señor  
 Dr. Jaime Díaz Zúñiga  
 Académico del Departamento de Odontología Conservadora  
 Facultad de Odontología  
 Universidad de Chile  
 Co-Investigador Proyecto FODO-2019-002  
**PRESENTE**

Estimado Dr. Díaz:

Se hace entrega del presente documento para formalizar la Inscripción en la Dirección de Investigación, DIFO, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, del Proyecto titulado: "Identificación del Polimorfismo G1181C del Gel TNFRSF11B (OPG) en Sujetos con Periodontitis Crónica y Sanos", en el cual usted es Co-Investigador junto con la Dra. Samanta Melgar Rodríguez y que está registrado en la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, con el Código FODO-2019-0002.

De acuerdo con lo solicitado, este proyecto estará inscrito en la DIFO con fecha de inicio a partir del 12 de julio de 2021 y la fecha de término será el 31 de marzo de 2023.

Deseándole el mayor de los éxitos, se despide atentamente,



**DR. ALFREDO MOLINA BERRÍOS**

*Director de Investigación  
 Facultad de Odontología  
 Universidad de Chile*

AMB/rem.